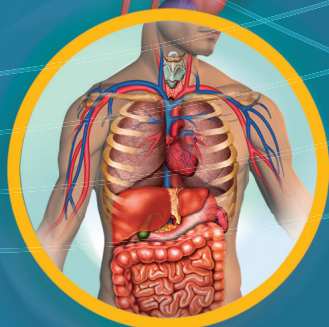
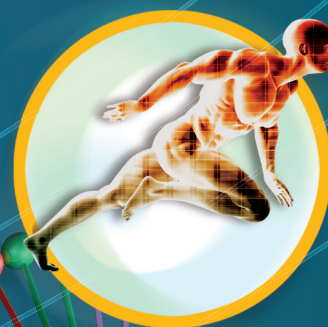
ORGANIZADORES
CRISTIANE COMINETTI
MARCELO MACEDO ROGERO
MARIA ADERUZA HORST

GENÔMICA NUTRICIONAL

DOS FUNDAMENTOS À NUTRIÇÃO MOLECULAR

Genômica Nutricional

Genômica Nutricional

DOS FUNDAMENTOS À NUTRIÇÃO MOLECULAR

Cristiane Cominetti
Marcelo Macedo Rogero
Maria Aderuza Horst
ORGANIZADORES

Editor gestor: Walter Luiz Coutinho
Editora: Ana Maria Silva Hosaka
Produção editorial: Marília Courbassier Paris
Projeto gráfico: Departamento Editorial da Editora Manole
Diagramação: Acqua Estúdio Gráfico
Capa: Rubens Lima

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Câmara Brasileira do Livro, SP, Brasil)

Genômica nutricional: dos fundamentos à nutrição molecular / Cristiane Cominetti, Marcelo Macedo Rogero, Maria Aderuza Horst, organizadores. -- Barueri, SP: Manole, 2017.

Vários autores.
Bibliografia.
ISBN 978-85-204-4015-5

1. Doenças 2. Genética humana 3. Genoma humano 4. Nutrição 5. Saúde I. Cominetti, Cristiane. II. Rogero, Marcelo Macedo. III. Horst, Maria Aderuza.

CDD-613.2
16-07014 NLM-OZ 050

Índices para catálogo sistemático:
1. Nutrição e genética: Ciências médicas
613.2

1ª edição – 2017

Editora Manole Ltda.
Av. Ceci, 672 – Tamboré
06460-120 – Barueri – SP – Brasil
Tel.: (11) 4196-6000 – Fax: (11) 4196-6021
www.manole.com.br
info@manole.com.br

Impresso no Brasil
Printed in Brazil

Dedicatória

Dedicamos esta obra às nossas famílias, aos mestres que nos mostraram o caminho da ciência e da pesquisa, aos nossos colaboradores e a todos os apaixonados pela nutrição e pela genômica nutricional!

Cristiane Cominetti
Marcelo Macedo Rogero
Maria Aderuza Horst

Organizadores

Cristiane Cominetti

Nutricionista pela Universidade Estadual do Centro-Oeste (Unicentro), mestre e doutora em Ciência dos Alimentos pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP). Pós-doutorado pela FCF/USP. Professora adjunta da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Goiás (Fanut/UFG). Professora permanente dos programas de pós-graduação em Nutrição e Saúde da Fanut e em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina/UFG. Líder do grupo de pesquisa "Genômica nutricional e alterações metabólicas relacionadas às doenças crônicas não transmissíveis" no CNPq. Coorganizadora do livro *Bases bioquímicas e fisiológicas da nutrição: nas diferentes fases da vida, na saúde e na doença*, publicado pela Editora Manole.

Marcelo Macedo Rogero

Nutricionista pela Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP/USP). Especialista em Nutrição em Esportes pela Associação Brasileira de Nutrição (Asbran). Mestre, doutor e pós-doutorado em Ciência dos Alimentos pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (FCF/USP). Pós-doutorado pela Faculdade de Medicina da Universidade de Southampton, Inglaterra. Professor doutor do Departamento de Nutrição da FSP/USP. Coordenador do Laboratório de Genômica Nutricional e Inflamação (Genuin).

Maria Aderuza Horst

Nutricionista pela Universidade Estadual do Centro-Oeste (Unicentro). Doutora em Ciência dos Alimentos pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP). Pós-doutorado em Ciência dos Alimentos (FCF/USP) e no Laboratório de Biologia Molecular do Câncer pela Universidade Federal de São Paulo (Unifesp). Professora adjunta da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Goiás (Fanut/UFG) e colaboradora do programa de pós-graduação em Nutrição e Saúde (PPG-NUT) na mesma instituição. Líder do grupo de pesquisa "Genômica nutricional e alterações metabólicas relacionadas às doenças crônicas não transmissíveis" no CNPq.

Colaboradores

Alessandro de Carvalho Cruz

Farmacêutico-bioquímico pela Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS). Mestre em Farmacologia pela Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Doutorando em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Goiás (UFG). Foi bolsista da Fundação de Apoio à Universidade de São Paulo (Fusp) e gerente de laboratório analítico do Núcleo de Bioequivalência e Estudos Clínicos da Universidade Federal de São Paulo (Nubec/Unifesp).

Aline Martins de Carvalho

Nutricionista pela Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP/USP) e mestre em Ciências pela mesma instituição. Estágio em pesquisa na Harvard School of Public Health, Estados Unidos. É nutricionista da Coordenadoria de Alimentação Escolar da Prefeitura de São Paulo. Doutoranda do programa de pós-graduação em Nutrição em Saúde Pública da FSP. É coordenadora do projeto de extensão Sustentare, da USP.

Ana Carolina de Carvalho

Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Unesp). Mestre e doutora em Ciências pelo programa de pós-graduação em Biologia Molecular da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp). Pós-doutorado em Oncologia pela Fundação Pio XII/Hospital de Câncer de Barretos e pesquisadora do Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular da mesma instituição.

Ana Maria Pita Lottenberg

Mestre e doutora em Ciência dos Alimentos pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP). Estágio de aperfeiçoamento no Ottawa Heart Institute, Canadá. Pesquisadora da disciplina de Endocrinologia do Laboratório de Lípides da Faculdade de Medicina da USP (FM/USP). Coordenadora do curso de especialização em Nutrição nas Doenças Crônicas Não Transmissíveis do Hospital Israelita Albert Einstein. Membro do Núcleo de Nutrição da Sociedade Brasileira de Cardiologia.

Ana Paula de Melo Loureiro

Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade de São Paulo (USP). Doutora em Bioquímica pela USP. Pós-doutorado pelo Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP e pelo Cancer Center Research Building da Universidade de Minnesota, Estados Unidos. Professora doutora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP).

Ana Paula Nunes Bento

Nutricionista pela Universidade Federal de Goiás (UFG). Pós-graduada em Nutrição Esportiva (Faculdade Redentor). Mestre em Nutrição e Saúde (UFG). Acadêmica do curso de Medicina (UFG).

Andre Luiz Vettore

Graduado em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Mestre em Genética e

doutor em Ciências pela Unicamp. Pós-doutorado pela Universidade Católica da Lovaina, Bélgica e pela Unicamp. Foi pesquisador sênior no Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer e professor visitante da Duke-NUS Medical School, Singapura. É professor adjunto da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp).

Antonio Anax Falcão de Oliveira

Graduado em Farmácia pela Universidade Anhembi Morumbi (UAM). Doutorando em Toxicologia e Análises Toxicológicas no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP), com período sanduíche no Departamento de Bioquímica Clínica da Universidade de Cambridge, Inglaterra.

Bárbara Rita Cardoso

Nutricionista pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Especialista em Nutrição Clínica Funcional pela Unicsul/VP. Mestre em Nutrição Humana Aplicada pela Universidade de São Paulo (USP). Doutora em Ciência dos Alimentos pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (FCF/USP). Pós-doutorado pelo The Florey Institute of Neuroscience and Mental Health da Universidade de Melbourne, Austrália. Vencedora do Prêmio Jovem Cientista 2015 na categoria Mestre-doutor.

Barbara Santarosa Emo Peters

Nutricionista pela Universidade Federal de Ouro Preto (Ufop). Especialista em Nutrição Clínica pelo Ganep. Doutora em Saúde Pública pela Universidade de São Paulo (USP). Pós-doutorado em Osteometabolismo na disciplina de Endocrinologia Clínica do Departamento de Medicina da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (EPM/Unifesp). Pós-doutoranda e pesquisadora cadastrada no programa de pós-graduação em Nutrição em Saúde Pública do Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública da USP (FSP/USP).

Bruna Zavarize Reis

Nutricionista pela Universidade Federal de Sergipe (UFS). Mestre em Nutrição Humana Aplicada pela Universidade de São Paulo (USP). Doutoranda em Ciência dos Alimentos no Laboratório de Nutrição-Minerais do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (FCF/USP).

Carla Cristina de Morais

Nutricionista pela Universidade Federal de Goiás (UFG). Mestre em Nutrição e Saúde pela Faculdade de Nutrição da UFG. Doutoranda em Ciências da Saúde pela Faculdade de Medicina da UFG. Atua nas áreas de nutrigenética e doenças cardiovasculares.

Célia Colli

Graduada em Farmácia Bioquímica pela Universidade de São Paulo (USP). Mestre em Análises Clínicas e Toxicológicas e doutora em Ciências dos Alimentos pela USP. Estágio no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares e bolsista da Universidade das Nações Unidas no Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (Inta) da Universidade do Chile. Foi editora científica da *Nutrire*, revista publicada pela Sban. Assessora *ad hoc* da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), dos periódicos *Food Chemistry*, *Nutrition Research Brazilian Journal of Pharmaceutical Science* e *Revista de Farmácia,* da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Unesp). Professora doutora do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (FCF/USP). Orientadora dos programas de pós-graduação em Ciência dos Alimentos e Nutrição Humana Aplicada da USP. Experiência em pesquisa na área de nutrição, com ênfase em análise nutricional de população e nutrição experimental, atuando principalmente na área de minerais em alimentos e nutrição, e tendo sido autora de livros e artigos publicados na área.

Clóvis Paniz

Farmacêutico pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Especialista em Laboratório Clínico e mestre em Bioquímica Toxicológica pela UFSM. Doutor em Análises Clínicas pela Universidade de São Paulo (USP).

Cristiane Cominetti

Nutricionista pela Universidade Estadual do Centro-Oeste (Unicentro), mestre e doutora em Ciência dos Alimentos pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP). Pós-doutorado pela FCF/USP. Professora adjunta da Faculdade de Nu-

trição da Universidade Federal de Goiás (Fanut/UFG). Professora permanente dos programas de pós-graduação em Nutrição e Saúde da Fanut e em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina/UFG. Líder do grupo de pesquisa "Genômica nutricional e alterações metabólicas relacionadas às doenças crônicas não transmissíveis" no CNPq. Coorganizadora do livro *Bases bioquímicas e fisiológicas da nutrição: nas diferentes fases da vida, na saúde e na doença*, publicado pela Editora Manole.

Danielle Fontes de Almeida

Nutricionista pelo Centro Universitário São Camilo. Mestre em Ciências pela Faculdade de Medicina da USP (FM/USP). Especialista em Terapia Nutricional e Nutrição Clínica pelo Ganep. Atualmente, especializa-se em Fitoterapia Funcional pelo Instituto Valéria Paschoal (VP).

Dan Linetzky Waitzberg

Cirurgião do aparelho digestivo, especialista na área e em gastroenterologia e nutrição enteral e parenteral. Mestre, doutor e livre docente em Cirurgia pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM/USP). Professor associado do Departamento de Gastroenterologia e coordenador do Laboratório de Metabologia e Nutrição em Cirurgia Digestiva (Metanutri) da FM/USP. Coordena a área de Nutrologia do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (Icesp) e é coordenador clínico das equipes multiprofissionais de terapia nutricional (EMTN) na mesma instituição, no Instituto Central do Hospital das Clínicas de São Paulo e no Hospital Santa Catarina. Diretor do Ganep Nutrição Humana.

Dennys Esper Cintra

Graduado em Nutrição pela Universidade de Alfenas (Unifenas). Mestre em Ciências da Nutrição pela Universidade Federal de Viçosa (UFV). Doutor e pós-doutorado em Clínica Médica pela Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Especialista em Jornalismo Científico (Unicamp). Professor doutor na área de nutrigenômica na Unicamp e coordenador do Laboratório de Genômica Nutricional (Labgen) e do Centro de Estudos em Lipídios e Nutrigenômica (Celn), ambos da mesma instituição.

Dirce Maria Lobo Marchioni

Nutricionista pela Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP/USP). Mestre e doutora pelo programa de pós-graduação em Saúde Pública da FSP/USP, e livre docente pela mesma instituição. Estágio em pesquisa na International Agency for Research on Cancer (Iarc), França. Foi professora visitante na Escola Nacional de Saúde Pública (Fiocruz) e no Imperial College London, Inglatera. Professora associada do Departamento de Nutrição da FSP/USP. Atua nas áreas de nutrição, epidemiologia nutricional, saúde pública e análise nutricional da população.

Eduardo de Carli

Nutricionista pela Universidade Federal de Pelotas (Ufpel). Doutorando em Ciência dos Alimentos pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP).

Elvira Maria Guerra-Shinohara

Farmacêutica bioquímica pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Pontifícia Universidade de Campinas (PUC-Campinas). Mestre e doutora em Farmácia (Análises Clínicas) pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP). Pós-doutorado pela Universidade de Oxford, Reino Unido. Professora associada do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF/USP.

Fábio Pires Pereira

Nutricionista pela Faculdade de Ciências da Nutricão e Alimentação da Universidade do Porto, Portugal. Trabalhou nas áreas de susceptibilidade genética a doenças inflamatórias intestinais e câncer no Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (Ipatimup). Doutor em Bioquímica, Biologia Molecular e Biomedicina pela Faculdade de Medicina da Universidade Autônoma de Madri, Espanha. Trabalhou como investigador no Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, em Madri, Espanha, dedicando-se ao papel do receptor da vitamina D no câncer de cólon. É autor de inúmeros trabalhos publicados em revistas internacionais e reúne vários prêmios.

Fernando Salvador Moreno

Médico pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP). Doutor em Medicina Interna pela Universidade de Düsseldorf, Alemanha. Professor titular do Departamento de Ali-

mentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (FCF/USP).

Francisco Bolaños-Jimenez

Graduado em Farmácia pela Universidade Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México. Mestre em Farmacologia pelo Centro de Pesquisa e Estudos Avançados, México. Doutor em Farmacologia Molecular pela Universidade de Paris VI Pierre et Marie Curie, França. Foi pesquisador associado no Instituto Nacional de Saúde e Pesquisa Médica (Inserm). Especialista em neurobiologia e biologia molecular. É pós-doutorando no Instituto Pasteur, em Paris, França, e no Laboratório de Fisiopatologia Molecular da Retina, da Universidade de Estrasburgo, também na França, e pesquisador sênior do Instituto Nacional de Investigação Agronômica (Inra) em Nantes, no mesmo país. Sua atividade de pesquisa atual está focada no estudo de como alterações dos mecanismos epigenéticos que regulam a expressão gênica definem a relação entre desnutrição ou *overnutrition* no início da vida e o desenvolvimento de um fenótipo patológico na idade adulta.

Francisco Leonardo Torres-Leal

Graduado em Educação Física pela Universidade Federal do Piauí (UFPI). Mestre em Nutrição Humana Aplicada pela Universidade de São Paulo (USP). Doutor em Fisiologia Humana pela mesma instituição. Professor do Departamento de Biofísica e Fisiologia da UFPI.

Franco Maria Lajolo

Farmacêutico bioquímico pela Universidade de São Paulo (USP). Doutor em Ciência dos Alimentos pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (FCF/USP). Pós-doutorado pelo Massachusetts Institute of Technology (MIT), Estados Unidos. Foi vice-reitor da USP e, em 2015, ganhou o Prêmio Jovem Cientista do CNPq na categoria "Mérito científico". Em 2016, foi agraciado com o Prêmio Péter Murányi – Alimentação. É professor sênior da FCF/USP e conselheiro nato da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, além de membro da Comissão de Assessoramento Técnico Científico em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos (CTCAF) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), do Ministério da Saúde. Membro titular da Academia de Ciências do Estado de São Paulo e membro da International Union of Food Science and Technology (Iufost). Diretor de Projetos do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Alimentos e Nutrição (Napan) da USP e pesquisador principal do Food Research Center (Forc), Centro de Pesquisa, Inovação e Difusão (Cepid) da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp).

Graziela Biude Silva

Nutricionista pelo Centro Universitário São Camilo. Mestre e doutoranda em Ciência dos Alimentos (área de Nutrição Experimental) pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP).

Guilherme Pedron Formigari

Graduado em Ciências do Esporte pela Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Mestre em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo (Unicamp). Pesquisador associado do Laboratório de Genômica Nutricional (Labgen) da Unicamp.

Guilherme Wataru Gomes

Graduado em Farmácia Bioquímica pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP). Mestre em Ciências pelo programa de pós-graduação em Farmácia (Análises Clínicas) da FCF/USP. Doutorando pela mesma instituição.

João Bosco Pesquero

Químico pela Universidade de São Paulo (USP). Mestre e doutor em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) pela Universidade Federal de São Paulo (Unifesp). Pós-doutorado em Biologia Molecular pela Universidade de Heidelberg e pelo Instituto Max-Delbrück para Medicina Molecular, Alemanha. Sócio-fundador da Proteobrás – Desenvolvimento biotecnológico e da Exxtend – Solução em oligos.

Jorge Amil Dias

Licenciado em Medicina pela Faculdade de Medicina da Universidade do Porto (FMUP), Portugal. Especialista em Pediatria e Gastroenterologia Pediátrica. Coordenador da Unidade de Gastroenterologia Pediátrica do Centro Hospitalar de São João, Portugal. Membro do grupo de trabalho sobre doenças inflamatórias intestinais e presidente do grupo de trabalho sobre a esofagite eosinofílica, além de membro da Comissão de Ética, da European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition (ESPGHAN). Presidente do Colégio Português de Gastroenterologia Pediátrica. Consultor-editor para

o *Journal of Food Allergy* e editor associado da *Orphanet Journal of Rare Diseases and Frontiers in Pediatric Gastroenterology*, além de membro do conselho editorial do *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. Membro da Comissão de Auditoria e Qualidade na Ordem dos Médicos em Portugal. Atua nas seguintes áreas de investigação: diarreia aguda e desidratação, doença inflamatória intestinal, esofagite eosinofílica e doença celíaca.

José Rodrigo Pauli

Graduado em Educação Física pela Universidade Estadual Paulista (Unesp) e mestre em Ciências da Motricidade pela mesma instituição. Doutor e pós-doutorado em Clínica Médica pela Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Professor doutor na área de Ciências do Esporte da Unicamp e coordenador do Laboratório de Biologia Molecular do Exercício (Labmex), da mesma universidade.

Josiane Steluti

Nutricionista pela Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP/USP). Mestre em Ciências e doutora pelo programa de pós-graduação Nutrição em Saúde Pública da mesma instituição. Pós-doutoranda no Departamento de Nutrição da FSP/USP. Experiência na área de nutrição clínica (Hospital das Clínicas, Hospital São Lucas e Hospital Alemão Oswaldo Cruz), alimentação e nutrição institucional (Arno e Banco Safra), avaliação do consumo (FSP/USP, Centro de Recuperação e Educação Nutricional - Cren e Instituto da Criança), bioestatística (FSP/USP), docência e supervisão de estágio (FSP/USP e Hospital das Clínicas).

Juliana Xavier de Miranda Cerqueira

Nutricionista pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Mestre em Ciências dos Alimentos pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP). Doutoranda em Nutrição Clínica pela Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto (FCNAUP), Portugal. Investigadora doutoral pelo "Coeliac disease study group", da Universidade de Tampere, Finlândia. Membro do grupo de investigação "Genetic dynamics of cancer cells", do Instituto de Patologia e Imunologia Molecular e do Instituto de Investigação e Inovação em Saúde da Universidade do Porto, Portugal. Experiência com biologia molecular e bioinformática aplicadas aos *Genome Wide Association Studies* (GWAS) e na área de genômica nutricional, dedicando-se ao estudo molecular da genética do câncer e doença celíaca em modelos *in vitro* e em seres humanos.

Kelly Virecoulon Giudici

Nutricionista pela Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP/USP). Doutora em Ciências na área de Nutrição em Saúde Pública pela USP. Foi pesquisadora visitante na College of Health and Human Sciences da Purdue University, Estados Unidos. Atualmente participa da Equipe de Pesquisa em Epidemiologia Nutricional (Eren) da Université Paris 13, França, desenvolvendo estudo sobre trajetórias de crescimento e risco para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis.

Lana Pacheco Franco

Nutricionista pela Universidade Federal de Goiás (UFG). Pós-graduada em Nutrição Esportiva pela Faculdade Redentor/RJ. Mestre em Nutrição e Saúde (UFG).

Laura Helena Gasparini Fernandes

Biomédica pela Faculdades Metropolitanas Unidas de São Paulo. Doutoranda em Ciência dos Alimentos, área de Nutrição Experimental, pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP).

Leonardo Antonio Mamede Zornoff

Médico pela Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Unesp). Residência em Clínica Médica e doutor em Fisiopatologia em Clínica Médica pela Unesp. Pós-doutor no Brigham and Women's Hospital, Universidade de Harvard, EUA. Professor livre-docente e titular do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB/Unesp).

Lígia Araújo Martini

Nutricionista. Doutora em Ciências na área de nutrição pela Universidade Federal de São Paulo (Unifesp). Professora livre-docente do Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP/USP). Pós-doutorado no Laboratório de Biodisponibilidade de Nutrientes no Jean Mayer Human Nutrition Research Center on Aging at Tufts University Boston, MA. USA. Foi pesquisadora visitante no Labo-

ratório de Vitamina D e Metabolismo Ósseo da Boston University, Boston, MA, USA.

Lucas Carminatti Pantaleão

Nutricionista pela Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP/USP). Mestre em Ciência dos Alimentos pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (FCF/USP) e doutor em Ciências pelo Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB/USP). Pós-doutorando no Institute of Metabolic Science da University of Cambridge, Inglaterra. Membro da Comissão de Comunicação da Sociedade Brasileira de Nutrição e do Grupo de Estudos em Crescimento, Nutrição e Exercício Físico do Laboratório de Bioquímica da Nutrição da USP.

Luiza Nicolisi Guido

Bacharel em Ciências dos Alimentos pela Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo (Esalq/USP). Doutor em Ciência dos Alimentos, área de nutrição experimental pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, com período sanduíche na Université de Nantes, França. Realizou estágio em Nutrigenômica na LaSalle Beauvais, França.

Maíra Cristina Menezes Freire

Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Vale do Rio doce (Univale), mestre e doutora em Genética pela Universidade Federal de Viçosa (UFV). Doutorado sanduíche pela University of Missouti, Columbia, MO, EUA. Pós-doutora em Genética Humana e Médica pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Pesquisadora sênior do setor de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) do Instituto Hermes Pardini (IHP), Belo Horizonte.

Marcelo Macedo Rogero

Nutricionista pela Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP/USP). Especialista em Nutrição em Esportes pela Associação Brasileira de Nutrição (ASBRAN). Mestre e Doutor em Ciência dos Alimentos pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Pós-doutorado em Ciência dos Alimentos pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Pós-doutorado pela Faculdade de Medicina da Universidade de Southampton, Inglaterra. Professor Doutor do Departamento de Nutrição da FSP/USP.

Márcia Regina Cominetti

Bióloga pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), doutorada em Ciências pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e pós-doutora no Institute de la Santé et de la Recherche Médicale, Paris, França. Docente do Departamento de Gerontologia da UFSCar. Coordenadora do Laboratório de Biologia do Envelhecimento (Laben/UFSCar).

Marco Aurélio Ramirez Vinolo

Graduado em Farmácia e Bioquímica pela Universidade de São Paulo (USP), doutor em Fisiologia Humana pela USP. Pós-doutor no Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Docente do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).

Maria Aderuza Horst

Nutricionista pela Universidade Estadual do Centro Oeste (Unicentro), doutora e pós-doutora em Ciência dos Alimentos pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP), pós-doutora no Laboratório de Biologia Molecular do Câncer pela Universidade Federal de São Paulo (Unifesp). Professora adjunta da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Goiás (Fanut/UFG). Professora colaboradora do Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde (PPG-NUT) da Fanut/UFG. Líder do grupo de pesquisa Genômica Nutricional e Alterações Metabólicas Relacionadas às Doenças Crônicas Não Transmissíveis do CNPq.

Maria Carolina Borges

Nutricionista, mestre em Nutrição em Saúde Pública pela Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP/USP) e doutora em Epidemiologia pela Universidade Federal de Pelotas.

Maria Daniel Vaz de Almeida

Nutricionista pela Universidade do Porto, Portugal. Doutora em Nutrição pelo King's College London, Reino Unido. Professora Catedrática na Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto (FCNAUP). Cofundadora da Sociedade Portuguesa de Nutrição e Ciências da Alimentação. Coordenadora do *Guia para uma alimentação saudável e ecológica*. Coautora do livro *Chemistry of the Mediterranean Diet*. Coorde-

nadora portuguesa de 17 projetos europeus relacionados à alimentação e promoção da saúde, dentre os quais: LIPGENE: "Diet, Genomic and the Metabolic Syndrome" e "FOOD4ME – Personalised Nutrition: an integrated analysis of opportunities and challenges".

Maria Silvia Ferrari Lavrador

Nutricionista pela Universidade Federal de Alfenas (Unifal), mestre em Ciências e Especialista em Nutrição Materno Infantil pela Universidade Federal de São Paulo (Unifesp). Especialista em Nutrição em Doenças Crônicas não Transmissíveis pelo IP do Hospital Albert Einstein. Doutoranda pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) no Laboratório de Lípides (LIM-10).

Milessa da Silva Afonso

Nutricionista pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Unesp) mestre em Ciência dos Alimentos pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP) e doutora em Ciências pelo Programa de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

Mônica Yamada

Nutricionista pela Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP/USP) e mestre em Nutrição em Saúde Pública pela USP.

Neuza Mariko Aymoto Hassimotto

Farmacêutica com habilitação em Análises Clínicas pela Universidade Estadual de Londrina (UEL), mestre em Ciências de Alimentos pela UEL e doutora em Ciência dos Alimentos pela Faculdade de Ciência Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP). Pós-doutora em Ciência dos Alimentos pela FCF/USP. Docente no Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da FCF/USP. Pesquisadora do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Alimentos e Nutrição (Napan) da USP e do Food Research Center – Forc (Cepid-Fapesp).

Paula Schmidt Azevedo Gaiolla

Médica pela Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Unesp). Residência em Clínica Médica Geral e em Terapia Intensiva pela Unesp. Doutora em Fisiopatologia em Clínica Médica pela Unesp. Pós-doutora no Weill Cornell Medical College, NY, EUA. Professora da disciplina de Nutrologia, do Departamento de Clínica Médica e coordenadora da residência médica da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB/Unesp). Coordenadora da Comissão de Comunicação da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição.

Paulo Eduardo Latorre Martins Tavares

Biomédico pela Faculdades Metropolitanas Unidas de São Paulo. Doutorando em Ciência dos Alimentos, área de Nutrição Experimental, pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP).

Pryscila Dryelle Sousa Teixeira

Nutricionista pela Universidade Federal de Sergipe (UFS), mestre em Ciências, área de Nutrição Experimental, pelo Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP) e doutoranda em Fisiologia pelo Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da USP.

Regina Mara Fisberg

Nutricionista pela Faculdade São Camilo, mestre e doutora pela Universidade Federal de São Paulo (Unifesp). Livre-docente pela Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP/USP). Docente e pesquisadora do Departamento de Nutrição da FSP/USP. Chefe do Departamento de Nutrição da FSP/USP.

Renata Aparecida Candido da Silva

Nutricionista pelo Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Unesp). Especialização em Bases Nutricionais da Atividade Física pela Universidade Estácio de Sá. Mestre em Fisiopatologia em Clinica Médica pela Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB/Unesp). Doutoranda na FMB/Unesp.

Renata Juliana da Silva

Nutricionista pela Universidade São Judas Tadeu. Especialista em Fisiologia e Metabolismo Aplicados à Nutrição e Atividade Física, mestre em Ciências Morfofuncionais e doutoranda em Ciências Morfofuncionais pelo Instituto de Ciências Biomédicas (ICB/USP). Professora

das Faculdades Metropolitanas Unidas (FMU) e do Centro Paula Souza.

Renato Heidor

Farmacêutico pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP). Mestre e doutor em Ciência dos Alimentos, área de Nutrição Experimental, pela FCF-USP.

Ricardo Sobhie Diaz

Médico infectologista pela Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp). Residência médica em Clínica e Infectologia pela Unifesp. Mestre e doutor em Infectologia pela Unifesp. Pós-doutor em Pesquisa Básica com HIV pela Universidade da Califórnia em Berkeley, atuando no Irwin Memorial Blood Centrer em São Francisco. Professor associado e livre-docente da Disciplina de Infectologia da Escola Paulista de Medicina da Unifesp e chefe do Laboratório de Retrovirologia desta Instituição realizando pesquisa translacional em HIV/Aids. É membro do Consenso Brasileiro para Uso de Antirretrovirais em Adultos e Adolescentes do Ministério da Saúde, e atua como consultor na área de Laboratório do Departamento de DST/Aids e Hepatites Virais do Ministério da Saúde do Brasil. Foi membro eleito do conselho governamental da Sociedade Internacional de Aids representando a América Latina e Caribe de 2006 a 2014. É diretor médico do Laboratório Centro de Genomas em São Paulo.

Rita de Cássia Borges Castro

Nutricionista pela Universidade Potiguar. Mestre em Ciências pelo Departamento de Oncologia e Radiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM/USP). Especialização em Terapia Nutricional e Nutrição Clínica pelo Ganep.

Rodrigo Luiz Vancini

Profissional de Educação Física e especialista em Fisiologia do Exercício e Treinamento Desportivo pela Universidade Federal de São Paulo (Unifesp). Mestre e Doutor em Ciências pela Unifesp. Professor adjunto do Centro de Educação Física e Desportos (CEFD) da Universidade Federal do Espírito Santo (Ufes). Orientador do programa de pós-graduação *stricto sensu* (mestrado e doutorado em Educação Física), na linha de pesquisa Aspectos Biomecânicos e Respostas Fisiológicas ao Movimento Corporal Humano, do CEFD/Ufes.

Rui Curi

Farmacêutico-Bioquímico pela Universidade Estadual de Maringá (UEM). Mestre e doutor pelo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP). Professor titular do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB/USP.

Sergio Alberto Rupp de Paiva

Médico pela Pontifícia Universidade Católica de São Paulo (PUCSP). Mestre e doutor em Fisiopatologia em Clínica Médica pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Unesp). Pós-doutor no Jean Mayer USDA Human Nutrition Research Center on Aging, Tufts University, Boston, EUA. Professor titular de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB/Unesp). Vice-presidente da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição.

Sérgio Danilo Junho Pena

Graduação em Medicina pela Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Residência médica em Pediatria na Bowman Gray School of Medicine, BGSM, EUA. Residência médica em Pediatria no Health Sciences Children's Centre, University of Manitoba, HSC, Canadá. Doutor pelo Department of Human Genetics na University of Manitoba, Canadá. Pós-doutor no National Institute for Medical Research, NIMR, Inglaterra. Professor titular do Departamento de Bioquímica e Imunologia (UFMG). Diretor do Laboratório de Genômica Clínica da Faculdade de Medicina. Diretor Científico do Núcleo de Genética Médica de Minas Gerais (Gene). Diretor científico da Gene – Genealógica Central de Genotipagem de Animais. Membro titular da Academia Brasileira de Ciências, Academy of Sciences of the Developing World (TWAS), Academia Mineira de Medicina e Academia Mineira de Pediatria. Membro do Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia.

Silvana Auxiliadora Bordin da Silva

Graduada em Educação Física pela Pontifícia Universidade Católica de Campinas (Puccamp). Mestre e Doutora em Fisiologia pela Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Livre-docente na Universidade de São Paulo (USP). Professora associada do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da USP. Orientadora do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do ICB/USP. Orien-

tadora do Programa em Farmacologiada Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.

Silvia Maria Franciscato Cozzolino

Nutricionista pela Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP/USP). Mestre e doutora em Ciência dos Alimentos, área de Nutrição Experimental, pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (FCF/USP). Livre-docente e professora titular da FCF/USP. Orientadora dos Programas de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos (FCF/USP) e Nutrição Humana Aplicada (FCF/FEA/FSP – USP). Presidente da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição de 1997 a 2003 e de 2006 a 2009. Pesquisadora nível 1A do CNPq e consultora científica de instituições públicas e privadas. Atualmente é presidente do Conselho Regional de Nutricionistas da 3ª região (CRN-3) para o triênio 2015-2017.

Sophie Deram

Nutricionista franco-brasileira, doutora pelo Departamento de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM/USP), com trabalho sobre polimorfismos e obesidade infantil. Coordenadora do Projeto Genética do Programa de Transtornos Alimentares (Ambulim)/Laboratório de Neurociências LIM-27 do Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas (IPq – HCFMUSP). Especialista em Nutigenômica pela UC-Davis, Universidade da Califórnia, EUA. Coordena pesquisa sobre genética do Centro do Apetite e Transtornos Alimentares na USP. É autora do livro *O Peso das Dietas* no qual denuncia o efeito contraprodutivo das dietas no apetite e no peso corporal.

Tatiane Mieko de Meneses Fujii

Nutricionista pelo Centro Universitário São Camilo, mestre em Nutrição em Saúde Pública pela Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP/USP) e doutoranda em Nutrição em Saúde Pública pela FSP/USP. Nutrigeneticista do Centro de Genomas/SP, com experiência em interpretação de testes de Nutrigenética e aconselhamento Genômico Nutricional. Docente convidada de cursos de pós-graduação (Imen, Cefit e São Camilo).

Thomas Prates Ong

Farmacêutico-bioquímico e doutor em Ciência dos Alimentos pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP). Pós-doutor pela FCF/USP e pesquisador visitante na University of Cambridge, Reino Unido. Professor do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da FCF/USP. Coordenador do Laboratório de Nutrigenômica e Programação. Pesquisador principal do Food Research Center (FoRC, Cepid/Fapesp). Secretário geral da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição (Sban; triênio 2016-2018).

Tiago Franco de Oliveira

Biomédico pelas Faculdades Integradas Einstein de Limeira. Doutor em Toxicologia e Análises Toxicológicas pela Universidade de São Paulo (USP). Pós-doutor em Toxicologia pelo Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Membro diretor da Sociedade Brasileira de Toxicologia (2016-2017).

Vinícius Fernandes Cruzat

Nutricionista pelas Faculdades Metropolitanas Unidas (FMU). Licenciatura plena em Educação Física pela Universidade Luterana do Brasil (Ulbra). Especialista em Medicina Esportiva e Ciências da Saúde pela Faculdade de Educação Física e Ciências do Desporto da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Mestre e doutor em Ciência dos Alimentos, área de Nutrição Experimental, pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Universidade de São Paulo (USP). Pós-doutorando no Instituto de Ciências Biomédicas (ICB), Departamento de Fisiologia e Biofísica da USP. Pós-doutor na School of Biomedical Sciences, Faculty of Health Sciences e School of Public Health, Curtin University (CUT), Austrália.

William Festuccia

Graduado em Educação Física pela Universidade de Ribeirão Preto (Unaerp). Doutor em Fisiologia Humana pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP). Pesquisador visitante na Georgia State University, Atlanta, GA, EUA. Pós-doutor pela Laval University de Quebec, Canadá. Pós-doutor visitante pelo Whitehead Institute of Biomedical Research, Massachusetts Institute of Technology (MIT), Cambridge, MA, EUA. Professor no Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da USP.

Sumário

Prefácio

Escrever o prefácio do livro *Genômica nutricional: dos fundamentos à nutrição molecular* é para mim uma imensa alegria, principalmente porque de alguma forma tive participação na formação dos seus organizadores, e sei da grande potencialidade de cada um. Os estudos de genética humana, de expressão gênica, de nutrigenômica, de nutrigenética e de epigenética vêm crescendo a todo o momento e, com certeza, estão revolucionando o conhecimento atual, ao demonstrar a importância da relação dos nossos genes com a alimentação e seus efeitos na saúde e doença. Este livro, portanto, constitui-se numa peça fundamental para que todos aqueles interessados em obter esse conhecimento possam ser introduzidos a este de forma gradual e, a partir daí, entender melhor detalhes e diferenças que muitas vezes os estudos científicos desenvolvidos anteriormente não conseguiam obter, ou seja, com respostas mais claras e conclusivas!

Nós somos diferentes, carregamos uma genética herdada que determina a forma como aproveitamos os nutrientes e como a composição das dietas pode influenciar as respostas do nosso organismo. Além disso, por meio do conhecimento do genoma, podemos conhecer os fatores individuais de risco para algumas doenças e, dessa forma, interferir para reduzir esse risco ou pelo menos para retardar o aparecimento da doença por meio de mudanças em nossa alimentação.

Os temas abordados neste livro – desde os aspectos básicos, evoluindo para os de aplicação desses conhecimentos e avançando para os de maior complexidade, relacionados às doenças e perspectivas futuras – de forma clara e em linguagem perfeitamente compreensível, certamente levarão o leitor a se envolver com a genômica nutricional e a entender que não podemos mais imaginar a nutrição isolada desses conhecimentos.

Finalizando, fortemente recomendo este livro e desde já parabenizo os professores Cristiane, Marcelo e Maria Aderuza e seus colaboradores por essa excelente contribuição aos alunos de Nutrição, aos nutricionistas e a todos os outros estudantes e profissionais da área da saúde.

Silvia Maria Franciscato Cozzolino

Apresentação

O livro *Genômica nutricional: dos fundamentos à nutrição molecular* é a primeira obra brasileira sobre o assunto e engloba, em profundidade, os aspectos mais atuais dessa área. O Projeto Genoma Humano, finalizado em 2003, foi um marco na história da humanidade e a publicação da sequência completa do genoma humano promoveu impactos em diversas áreas do conhecimento, inclusive na nutrição. Além disso, novas tecnologias e abordagens científicas resultaram no surgimento das ciências ômicas, incluindo a genômica, a transcriptômica, a proteômica e a metabolômica, as quais podem ser aplicadas em pesquisas sobre alimentação e nutrição, possibilitando a compreensão, em âmbito molecular, de como os nutrientes e compostos bioativos de alimentos (CBA) interagem com o material genético.

Assim, a genômica nutricional é uma ciência recente e multidisciplinar, que teve sua visibilidade e importância ampliadas nos últimos anos. Conceitualmente, abrange a nutrigenômica, a nutrigenética e a epigenômica nutricional, as quais se referem à maneira como os nutrientes e os genes interagem e como estes se expressam para revelar os resultados fenotípicos, incluindo o risco de doenças. A nutrigenômica estuda a forma como as interações entre os componentes da alimentação e o genoma afetam o padrão de expressão gênica. A nutrigenética estuda a influência da variabilidade genética entre os indivíduos na resposta à alimentação e nas diferenças no estado de saúde e no risco de doenças. Já a epigenômica nutricional estuda mecanismos epigenéticos de regulação da expressão gênica que não resultam em alterações na sequência dos nucleotídeos do DNA, bem como a capacidade de nutrientes e de CBA de modular tais mecanismos.

A primeira parte do livro abrange conceitos básicos de genética humana, incluindo aspectos históricos, base molecular da hereditariedade, padrões de herança genética, princípios básicos da genética de populações e genética da população brasileira. Essa parte engloba também aspectos relativos à expressão gênica, como estrutura do DNA e dos genes, maquinaria de transcrição, principais mecanismos envolvidos na regulação da expressão gênica, e tradução de proteínas. O objetivo é revisar conceitos importantes de genética e de genômica, de forma a facilitar a compreensão dos capítulos seguintes.

Na segunda parte do livro estão apresentados os capítulos que abrangem os fundamentos da nutrigenômica, da nutrigenética e da epigenômica nutricional. O primeiro aborda mecanismos de atuação de nutrientes e de CBA na regulação da expressão gênica e a interação entre essas substâncias e receptores nucleares. Relata, ainda, a importância da atuação de compostos alimentares na expressão gênica e a relação com o balanço entre saúde e doenças, exemplificando a atuação desses compostos na regulação dos processos inflamatório e de estresse oxidativo. O segundo capítulo engloba aspectos básicos de nutrigenética e informações sobre o Projeto Genoma Humano, o Projeto Hapmap e o Projeto 1000 Genomas. Na explanação sobre as principais variações genéticas estudadas – os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) – são exemplificadas as duas abordagens: baseada em genes candidatos, incluindo exemplos de SNP nos genes da metilenotetra-hidrofolato redutase (MTHFR), da apolipoproteína E (apoE) e do fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa); e estudos de associação ampla do genoma (GWAS). No último capítulo estão apresentados os fundamentos da epigenética e da nutrição, englobando definição e conceitos, organização da cromatina, principais mecanismos epigenéticos de regulação da expressão gênica (metilação do DNA, modificações em histonas e regulação por microRNA), bem como de que forma a nutrição influencia esses mecanismos.

Na terceira parte, encontram-se capítulos relativos ao papel de nutrientes e de CBA na regulação da expressão gênica. Especificamente, dentre os nutrientes, estão descritos glicose e frutose, glutamina, leucina, ácidos graxos (de cadeia curta, poli-insaturados e monoinsaturados), vitaminas A e do complexo B, zinco, selênio, ferro e magnésio. Os polifenóis representam os CBA. São relatados aspectos bioquímicos, fisiológicos e de biodisponibilidade dos nutrientes e compostos bioativos, bem como os mecanismos envolvidos na modulação da expressão gênica por essas substâncias, com base em evidências científicas de grande impacto.

A quarta parte do livro retrata a importância da relação entre nutrientes, genômica nutricional e o binômio saúde-doença. Estão apresentados os seguintes capítulos: "Inflamação", "Obesidade", "Vitamina D e doenças crônicas não transmissíveis", "Diabete melito tipo 2", "Doenças cardiovasculares, com enfoque em dislipidemias e no metabolismo da homocisteína", "Câncer", "Vírus da imunodeficiência humana", "Intolerância primária à lactose", "Intolerância ao glúten", "Sistemas antioxidantes", "*Imprinting* e programação metabólica", "Nutrigenômica e exercício físico", "Influência da genética no desempenho físico e esportivo" e "Bases biológicas e moleculares do envelhecimento". São relatados aspectos da epidemiologia e da fisiopatologia das doenças, bem como as associações entre SNP, a doença e aspectos nutricionais. Destacam-se, também, as influências de padrões alimentares ou suplementação nutricional na modulação da expressão gênica nas condições em questão.

A quinta e última parte resume os avanços e as perspectivas na área de genômica nutricional, incluindo os capítulos "Modelos para estudos de genômica nutricional", "Metabolômica aplicada aos estudos de genômica nutricional", "Métodos para avaliação do consumo alimentar habitual em estudos de genômica nutricional", "Polimorfismos avaliados em testes de nutrigenética disponíveis no mercado nacional e sua utilização na prática clínica" e "Biotética e testes (nutri)genéticos preditivos".

Cada capítulo foi cuidadosamente elaborado para atender às necessidades de estudantes de graduação e de pós-graduação e daqueles que tenham interesse em se aprofundar na área de genômica nutricional. É nosso sincero desejo que todo o esforço despendido na elaboração desta obra se reverta em aprimoramento do conhecimento e difusão do interesse por parte daqueles que buscam compreender aspectos de nutrição de forma mais aprofundada e robusta.

Por fim, é essencial destacar que a construção desta obra teve a colaboração inestimável de renomados pesquisadores brasileiros e estrangeiros da área de genômica nutricional. A cada um dos colaboradores registramos a nossa sincera gratidão e admiração.

Ao citar Charles Chaplin: "O assunto mais importante do mundo pode ser simplificado até ao ponto em que todos possam apreciá-lo e compreendê-lo. Isso é – ou deveria ser – a mais elevada forma de arte", desejamos a todos excelente leitura e aprendizado!

Cristiane Cominetti
Marcelo Macedo Rogero
Maria Aderuza Horst

Parte 1
Da genética à nutrição molecular

Bases da genética humana | 1

Maíra Cristina Menezes Freire
Sergio Danilo Junho Pena

INTRODUÇÃO

O sequenciamento completo do genoma humano, obtido a partir do Projeto Genoma Humano (PGH), tem permitido o estudo mais preciso dos genes e suas funções. Estudos realizados a partir dos resultados do PGH possibilitam a identificação de variações na sequência de nucleotídeos do DNA entre indivíduos, o que permite a observação de diferenças nas respostas individuais diante de fatores ambientais, como a alimentação. Em consequência dessas observações, surge a ideia de uma nova abordagem na área da saúde, a genômica personalizada. Nesta abordagem, é possível utilizar técnicas de altíssima eficiência para estudar as variações individuais e, dessa forma, obter mapas de predisposições genéticas de um indivíduo.[1]

Diante desse cenário, uma ciência relativamente nova vem ganhando cada vez mais força: a genômica nutricional, que inclui a nutrigenômica, a nutrigenética e a epigenômica nutricional. A nutrigenômica estuda como nutrientes e compostos bioativos de alimentos modulam o padrão de expressão gênica, enquanto a nutrigenética estuda os efeitos das variações genéticas em relação aos diferentes padrões alimentares.[2] A epigenômica nutricional estuda os mecanismos epigenéticos pelos quais a expressão gênica é regulada. Contudo, estes mecanismos não acarretam alterações na sequência dos nucleotídeos do DNA. Informações mais detalhadas serão abordadas nos Capítulos 3 a 5.

Com base no conhecimento de que o genoma de cada ser humano é único, com exceção de gêmeos monozigóticos, os estudos de nutrigenética têm como principal objetivo a identificação de variações em genes e em outros locais do DNA que tenham alguma relação com as respostas aos diferentes padrões de alimentação. Dessa forma, os resultados desses estudos poderão ser utilizados na reformulação das recomendações de ingestão de nutrientes e, consequentemente, na elaboração de planos alimentares e modificações de estilo de vida individualizadas, com informações específicas de acordo com o perfil genético.[3] No entanto, para que haja melhor compreensão da composição genética individual, de como os genes são herdados e de como estão distribuídos na população, é importante, em primeiro lugar, conhecer os princípios básicos da genética humana, que serão abordados neste capítulo.

BREVE HISTÓRICO DA GENÉTICA

Muito do conhecimento atual sobre a genética decorre de estudos realizados pelo monge austríaco Gregor Mendel. Ele realizou experimentos com cruzamentos de ervilhas de jardim e publicou seus resultados em 1865 na *Natural Science Association*, em Brunn, na República Tcheca. Tais experimentos demonstraram a existência de elementos individuais e autorreplicáveis, responsáveis pelo aparecimento de características hereditárias. De acordo com Mendel, esses elementos eram propagados de forma estável de geração em geração, conceito que se opunha às ideias preponderantes da época, de que a herança ocorria por meio de mistura de humores hereditários.[4]

No entanto, o trabalho de Mendel e, consequentemente, os princípios da hereditariedade passaram despercebidos na literatura científica por muitos anos. Somente em 1900, três pesquisadores independentes – Hugo de Vries, na Holanda; Carl Correns, na Alemanha; e Erich von Tschermak, na Áustria – tiveram acesso e conseguiram compreender a importância dos resultados obtidos por Mendel. Dessa forma, as leis de Mendel foram reco-

nhecidas após 35 anos, por textos publicados no mesmo volume da *Proceedings of the German Botanical Society*, onde Vries, Correns e Tschermark descreveram sua redescoberta.[5]

A partir dessa redescoberta, os anos seguintes foram repletos de novas pesquisas de extrema importância para a ciência que estava nascendo. Em 1902, Archibald Garrod descreveu a alcaptonúria, uma doença genética rara, como o primeiro exemplo humano de característica mendeliana. Em 1903, Willian Sutton, da Universidade de Columbia, Theodor Boveri, de Würzburg, e Nettie Stevens, observando o comportamento dos cromossomos durante a divisão celular, propuseram, independentemente, que os cromossomos seriam os portadores dos elementos herdáveis descritos por Mendel. Foi apenas em 1906 que o termo específico *genética* foi cunhado pelo biólogo Willian Bateson, que informou no Congresso Internacional de Botânica que uma nova ciência, ramo da fisiologia, estava sendo criada, a genética. Três anos depois, o botânico dinamarquês Wilhelm Johannsen cunhou o termo gene, para designar os fatores hereditários introduzidos por Mendel.[6] No mesmo ano, Johannsen introduziu dois outros conceitos fundamentais, o de genótipo – conjunto estático de genes de um indivíduo – e o de fenótipo – conjunto dinâmico de suas características observáveis.[1]

Durante as primeiras quatro décadas do século XX, o progresso na genética foi constante. No entanto, foi apenas a partir da década de 1940 que questões como a composição e a estrutura dos genes foram elucidadas. No ano de 1944, Oswald Avery, C. M. MacLeod e M. McCarty, por meio de experimentos com bactérias *Streptococcus pneumoniae*, descobriram que a molécula responsável pela hereditariedade era o ácido desoxirribonucleico (DNA). Tais autores publicaram: "o DNA deve ser considerado não apenas como estruturalmente importante, mas como funcionalmente ativo na determinação das atividades bioquímicas e das características específicas das células de pneumococos". Entretanto, foi apenas em 1952, após o experimento de Alfred Hershey e Martha Chase com fago T2, que a maioria dos biólogos foi convencida de que o material genético era composto por DNA.[5]

Na mesma época, George Beadle e Edward Tatum, ao realizarem experimentos com *Drosophilas*, levantaram a primeira sugestão da forma de ação dos genes pela hipótese um gene – uma enzima. Em 1953, James D. Watson e Francis Crick, a partir de experimentos de difração de raios X do DNA realizados por Rosalind Franklin, elucidaram a estrutura do DNA – uma dupla hélice, que se assemelha a uma escada em caracol, sendo cada metade uma cadeia de nucleotídeos unida por ligações fosfodiéster. Essa estrutura esclareceu o mecanismo para a capacidade de autoduplicação do DNA, bem como para a sua estabilidade.[4]

Depois da década de 1970, novas tecnologias de manipulação e análise de DNA surgiram e evoluíram rapidamente, permitindo avanços significativos nos estudos genéticos em geral, incluindo a genética médica. Nas últimas décadas, progressos marcantes foram feitos na compreensão da estrutura e da função dos genes, bem como dos cromossomos em nível molecular. Técnicas moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR), a clonagem, a utilização de enzimas de restrição e o sequenciamento de DNA têm permitido aos cientistas identificar genes que codificam proteínas humanas essenciais, bem como a localização de mutações e polimorfismos, o que possibilita maior compreensão sobre as doenças.[7]

Nesse contexto, o PGH foi um consórcio internacional que permitiu o entendimento detalhado da organização do genoma humano, a partir da elucidação da sequência de nucleotídeos do DNA. No entanto, ainda existe a necessidade de muitos estudos sobre o genoma humano. Metodologias avançadas para o sequenciamento de DNA, conhecidas como sequenciamento de nova geração (NGS, em inglês: *next generation sequence*), têm permitido uma análise ampla e mais rápida do genoma, o que facilita a identificação de genes responsáveis por diferentes doenças e por características de interesse. As maiores contribuições destes estudos são: a melhoria do diagnóstico, prognóstico e direcionamento do tratamento dos pacientes; os progressos no diagnóstico pré-natal; o aconselhamento genético; o diagnóstico precoce de doenças como o câncer; um melhor entendimento sobre condições complexas como doença de Alzheimer e autismo; e o tratamento e a redução do risco de doenças.[8]

EXPERIMENTOS DE MENDEL E SUAS LEIS

Gregor Mendel, após finalizar o ensino fundamental, ingressou no mosteiro agostiniano localizado na cidade de Brunn, na República Tcheca, o qual era dedicado ao ensino da ciência e à pesquisa científica. Assim, Mendel desenvolveu um programa de pesquisa com a ervilha de jardim (*Pisum sativum*), realizando cruzamentos de ervilhas com características distintas.[4]

Em seus experimentos, Mendel observou que o cruzamento de ervilhas com características contrastantes provenientes de linhagens puras (geração parental) para um determinado fator resultava em uma geração homogênea (F1) e igual a um dos progenitores. Observou também que a autofecundação das ervilhas dessa primeira geração resultava em uma segunda geração (F2), composta de plantas com as duas características presentes na

geração parental. Ao contar, na geração F2, o número de plantas com cada uma das características, observou que a proporção 3:1 se repetia – sendo três para a característica presente em todas as gerações e um para a característica presente na geração parental que desapareceu na geração F1 e voltou a aparecer na geração F2. Naquele momento, ele não conseguiu explicar de forma adequada os resultados obtidos, apesar de ter observado que eles obedeciam a um determinado padrão. Mendel então usou os termos "dominante" e "recessivo" para distinguir as duas características avaliadas – dominante para a característica que permanecia em todas as gerações e recessivo para a característica que desaparecia na geração F1, mas voltava a aparecer na geração F2.[5]

Para tentar encontrar uma explicação para os resultados encontrados, Mendel continuou seus experimentos. Ele autofecundou individualmente as plantas da geração F2 e contou novamente a quantidade de descendentes com cada uma das características previamente observadas. Observou que as plantas com a característica recessiva eram puras, pois somente produziam descendentes com as mesmas características. No entanto, parte daquelas com a característica dominante, quando autofecundadas, também só produzia plantas com a característica dominante, enquanto a outra parte produzia uma mistura de plantas com características dominantes e recessivas. A partir desses resultados, concluiu que a proporção 3:1, encontrada na geração F2, na verdade correspondia a uma proporção de 1:2:1 (1 de dominante puras, 2 de dominantes não puras e 1 de recessivas puras).[5]

Com esses resultados, Mendel delineou conclusões anteriormente inimagináveis. Deduziu a existência de elementos (atualmente conhecidos como genes) determinantes para a hereditariedade, e também que estes estariam em pares. Concluiu, ainda, que esses pares se segregavam independentemente para gerar os gametas e que, para a formação de um novo organismo, esses gametas se combinavam de forma aleatória, produzindo o zigoto.[6]

Nesse contexto, pode-se ainda citar alguns termos que atualmente são bastante conhecidos na genética. Os elementos que Mendel observou estarem em pares atualmente são caracterizados como alelos. Normalmente, existem duas possibilidades para o alelo, "A" e "a", por exemplo. De acordo com os resultados de Mendel, pode haver características dominantes puras, com alelos "AA"; características dominantes não puras, "Aa"; e características recessivas puras, "aa". Atualmente, a classificação para cada um desses genótipos é: homozigoto dominante, heterozigoto e homozigoto recessivo, respectivamente.

Para confirmar seus achados, Mendel realizou o cruzamento de plantas de F1 com plantas com características recessivas, esperando encontrar na prole uma proporção 1:1. O cruzamento de determinado genótipo com um totalmente homozigoto recessivo é conhecido como cruzamento teste. Tal proporção, de fato, foi obtida, confirmando o modelo de segregação igual e independente proposto por Mendel. Essa proporção é conhecida como Primeira Lei de Mendel ou Lei da Segregação: dois pares (alelos) de um gene se segregam de forma igual e independente para a formação dos gametas.[5]

Na busca por mais resultados, Mendel continuou realizando experimentos com linhagens que se diferenciavam por duas características: ervilhas lisas e verdes, e ervilhas rugosas e amarelas. O cruzamento entre duas linhas puras contrastantes resultou em uma geração F1 totalmente lisa e amarela, revelando a dominância dessas duas características, conforme tinha sido observado para o cruzamento de uma única característica. Em seguida, Mendel fez a autofecundação da geração F1, obtendo uma proporção de 9:3:3:1 (9 amarelas lisas, 3 amarelas rugosas, 3 verdes lisas e 1 verde rugosa).

Mendel avaliou os resultados obtidos e concluiu que a proporção de 9:3:3:1 correspondia à combinação de duas proporções 3:1, a qual era observada quando realizava cruzamentos de apenas uma característica. Tal observação permitiu outra conclusão, que hoje é conhecida como Segunda Lei de Mendel ou Lei da Distribuição Independente: os genes de diferentes *loci* são transmitidos independentemente. Os resultados foram testados para outras características das ervilhas e, ainda, avaliados pelo cruzamento teste.[7]

Quando os resultados obtidos por Mendel foram redescobertos em 1900, eles foram testados para outra variedade de organismos. Os resultados desses testes comprovaram que as leis de Mendel não se aplicavam apenas às ervilhas, mas que correspondiam ao padrão de herança fundamental, geralmente aplicável a todos os organismos.

BASE MOLECULAR DA HEREDITARIEDADE

Atualmente, sabe-se que os elementos estáveis responsáveis pela hereditariedade descritos por Mendel referem-se a genes contidos na molécula de DNA. O DNA é uma estrutura linear, em dupla hélice, composta de monômeros denominados nucleotídeos. Cada nucleotídeo, unidade básica do DNA, é composto por uma molécula do açúcar desoxirribose, um grupo fosfato e uma das bases nitrogenadas. Estas podem ser purínicas – adenina (A) e guanina (G) – ou pirimidínicas – citosina (C) e timina (T). Os nucleotídeos são conectados uns aos outros formando uma das hélices do DNA. A ligação entre dois nucleotídeos adjacentes se dá por meio de ligações fosfodiéster 5' – 3' entre as unidades de desoxirribose. No entanto,

o DNA é formado por duas cadeias polinucleotídicas, de polaridades opostas (antiparalelas). As duas cadeias nucleotídicas são mantidas unidas por pontes de hidrogênio que ocorrem entre bases nitrogenadas específicas: sempre uma adenina com uma timina, e uma citosina com uma guanina. Portanto, o DNA é uma molécula em dupla hélice, com fitas antiparalelas e complementares (Figura 1.1).

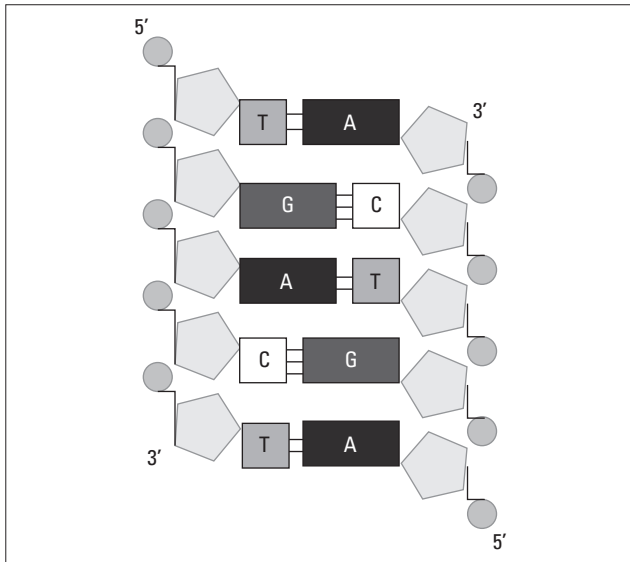



Figura 1.1 Esquema da estrutura do DNA. Duas cadeias polinucleotídicas, complementares e antiparalelas. Cada nucleotídeo é composto por uma molécula do açúcar desoxirribose, um grupo fosfato e uma das bases nitrogenadas. A ligação entre dois nucleotídeos adjacentes se dá por meio de ligações fosfodiéster; e entre duas bases nitrogenadas, por pontes de hidrogênio. A: adenina; C: citosina; G: guanina; T: timina.

A estrutura do DNA carrega o código genético que permite a transmissão exata da informação de uma célula-mãe para suas células-filhas, de uma geração para outra e a transmissão das informações necessárias para a produção das proteínas. Os genes, sequências de DNA nem sempre contínuas, contêm a informação genética necessária para a síntese de proteínas, e também são responsáveis pela transmissão das características hereditárias.[9]

Para que a informação contida no gene resulte corretamente na síntese de determinada proteína, dois processos básicos são necessários: a transcrição e a tradução. No processo de transcrição de um gene, a molécula de DNA, com o auxílio da maquinaria celular, será transcrita em uma molécula de RNA mensageiro (RNAm). Essa molécula de RNAm é transportada do núcleo para o citoplasma e, nesse local, com o auxílio dos ribossomos, a molécula de RNAm é traduzida em aminoácidos que formarão a proteína, processo denominado tradução.[8]

Do DNA à proteína

Genes são sequências de nucleotídeos no DNA que devem ser lidas pela maquinaria celular para gerar o seu produto específico, o RNAm, o qual, por meio do processo de tradução, dá origem a uma cadeia polipeptídica. O RNA é uma molécula semelhante ao DNA, com algumas diferenças: os nucleotídeos do RNA possuem uma ribose no lugar da desoxirribose e não têm a base nitrogenada timina, a qual é substituída pela uracila (U). O RNA é transcrito como uma molécula de fita única, enquanto o DNA, como mencionado anteriormente, é uma fita dupla.[8]

Para o início do processo de transcrição, a enzima RNA polimerase reconhece e se liga a uma região específica do DNA no início do gene. Essa região específica reconhecida pela RNA polimerase é conhecida como região regulatória e é representada pela sequência responsável pelo início correto da transcrição. Após a RNA polimerase ligar-se à região regulatória, a dupla fita de DNA se abre no sentido longitudinal pela quebra das pontes de hidrogênio, formando a bolha de transcrição, separando as duas fitas, das quais uma será molde para a síntese de RNA. Em humanos, assim como em todos os organismos eucarióticos, existem três tipos de RNA polimerases (I, II e III). A RNA polimerase I auxilia na formação dos RNA ribossômicos; a RNA polimerase II é a responsável pela transcrição do DNA em RNAm, e a RNA polimerase III sintetiza pequenas moléculas de RNA, como os RNA transportadores.[10]

O processo de transcrição, catalisado pela RNA polimerase II, começa no ponto de início transcricional na extremidade 5', move-se ao longo da cadeia molde e se estende até atingir um códon de terminação. Dessa forma, uma das cadeias de DNA servirá como fita molde, onde ocorrerá a polimerização da fita de RNA seguindo o mesmo padrão de complementariedade já descrito (C pareia com G e A com U).[5]

Na transcrição do RNAm, a primeira molécula produzida é conhecida como RNA primário ou pré-RNAm. Essa molécula passa por modificações, resultando na produção do RNAm ou maduro. Grande parte dos genes dos organismos eucarióticos, incluindo os humanos, é composta por íntrons e éxons, mas apenas estes últimos serão traduzidos para a síntese de proteínas. Portanto, a molécula de RNA passa por um processo conhecido como *splicing*.[9]

O *splicing* é o processo de remoção dos íntrons e união dos éxons após a transcrição do pré-RNAm para, dessa forma, produzir um RNAm maduro funcional. A análise das sequências de união íntron-éxon permitiu a identificação de nucleotídeos consenso nas regiões de cortes, sendo a conservação dessas regiões de extrema

importância para a precisão de todo o processo e na produção da molécula de RNAm correta. No entanto, uma mesma molécula de pré-RNAm pode produzir mais de um tipo de RNAm e, consequentemente, mais de um tipo de proteína, em razão do processo conhecido como *splicing* alternativo. Nesse processo, os exóns que compõem as moléculas de pré-RNAm são rearranjados de maneiras diferentes após a retirada dos íntrons, resultando em RNAm com diferentes composições de éxons, a partir do mesmo pré-RNAm e, consequentemente, em proteínas com sequências de aminoácidos distintas. Essa característica explica, pelo menos em parte, a discrepância do número de genes descritos para o genoma humano e o número de proteínas produzidas, uma vez que há muito mais proteínas do que genes descritos.

A produção do RNAm maduro ainda envolve estágios adicionais, nos quais as duas extremidades do transcrito são modificadas por adições de nucleotídeos suplementares. A extremidade 5' é modificada pela adição de uma "*cap*", que é um nucleotídeo na orientação oposta, protegendo assim essa extremidade; e a extremidade 3' é modificada pela adição de uma cauda poli(A) imediatamente após a sua clivagem. Após o término de todos os eventos de processamento pós-transcricional, o RNAm é exportado do núcleo através dos poros do envoltório nuclear para o citoplasma, onde será reconhecido pelos ribossomos, e então traduzido.[9]

No citoplasma ocorre a síntese de proteínas. Para que esse processo aconteça, os nucleotídeos da molécula de RNAm devem ser lidos e traduzidos em aminoácidos. Essa leitura, feita pelos ribossomos, que são compostos por RNA ribossômicos (RNAr), ocorre da extremidade 5' para a 3', sempre em grupos de três nucleotídeos, que são chamados de códons. Para o início desse processo, uma das subunidades do ribossomo liga-se a uma sequência curta de bases no início de cada RNAm, denominada sequência líder. Para a formação da cadeia polipeptídica, a subunidade grande do ribossomo se une ao complexo de iniciação e move-se ao longo do RNAm, traduzindo cada um dos códons. O primeiro códon a codificar um aminoácido será sempre um AUG, o qual atrai um RNA transportador (RNAt) de uma metionina. Esse aminoácido será, portanto, sempre o início da cadeia polipeptídica. Outros RNAt, com o auxílio da enzima peptidil-transferase, transportam os respectivos aminoácidos dos códons que estão sendo lidos e, sob a catálise de uma ribozima, forma-se uma ligação peptídica com o aminoácido anterior. A tradução continua até o ponto em que um dos códons de terminação (UGA, UAA ou UAG) é encontrado. A cadeia polipeptídica completa é então liberada pelo ribossomo, que se torna disponível para a síntese de outra proteína (Figura 1.2).[6]

Transmissão da informação genética

A compreensão de como o material hereditário é organizado e transmitido de uma célula para outra durante a divisão celular, bem como do processo de transmissão do genoma de geração em geração durante a reprodução, consiste em informação relevante para entendimento de diferentes aspectos da genômica nutricional.

Todo o material genético celular é encontrado sob a forma de uma massa compacta, confinada em um volume limitado. Essa massa é conhecida como cromossomo, uma estrutura filamentosa localizada no núcleo das células. A organização desse material é determinada por vários eventos coordenados que determinam os estados ativo e inativo, de acordo com o momento celular e porção do DNA, por exemplo, quando há necessidade de replicação ou transcrição. O único momento em que os cromossomos estão distribuídos por todo o núcleo como uma massa homogênea e disforme é durante a divisão celular. Assim, durante o processo de divisão celular, os cromossomos se apresentam condensados ao máximo, podendo ser facilmente visualizados. Nesse período, em razão desse grande enovelamento, os genes ficam inativos, não podendo ser transcritos.[8]

Cada cromossomo carrega determinado conjunto de genes, os quais são arranjados linearmente ao longo do DNA em posições específicas, denominadas *loci*. Os cromossomos são encontrados em pares, conhecidos como cromossomos homólogos. Para que os cromossomos sejam homólogos, eles precisam carregar os mesmos genes nas mesmas posições; no entanto, esses genes podem ser idênticos ou apresentar formas variantes, conhecidas como alelos.[10]

Todos os cromossomos apresentam uma constrição primária, conhecida como centrômero. Essa constrição divide os cromossomos em dois braços: o braço curto, também conhecido como "p" (do francês *petit* – pequeno); e o braço longo, conhecido como "q" (do francês *queue* – cauda). A posição dos centrômeros, que varia entre os diferentes tipos de cromossomos, permite que eles sejam classificados em quatro tipos: metacêntricos, com o centrômero localizado no meio do cromossomo; acrocêntricos, com o centrômero localizado próximo à extremidade do cromossomo; telocêntricos, com o centrômero localizado na extremidade do cromossomo; e submetacêntricos, em que os centrômeros estão em uma posição intermediária.[5]

Outra característica importante dos cromossomos é a presença dos telômeros, que são a extremidade terminal de cada um deles. Os telômeros apresentam uma sequência específica repetida várias vezes e são essenciais para a

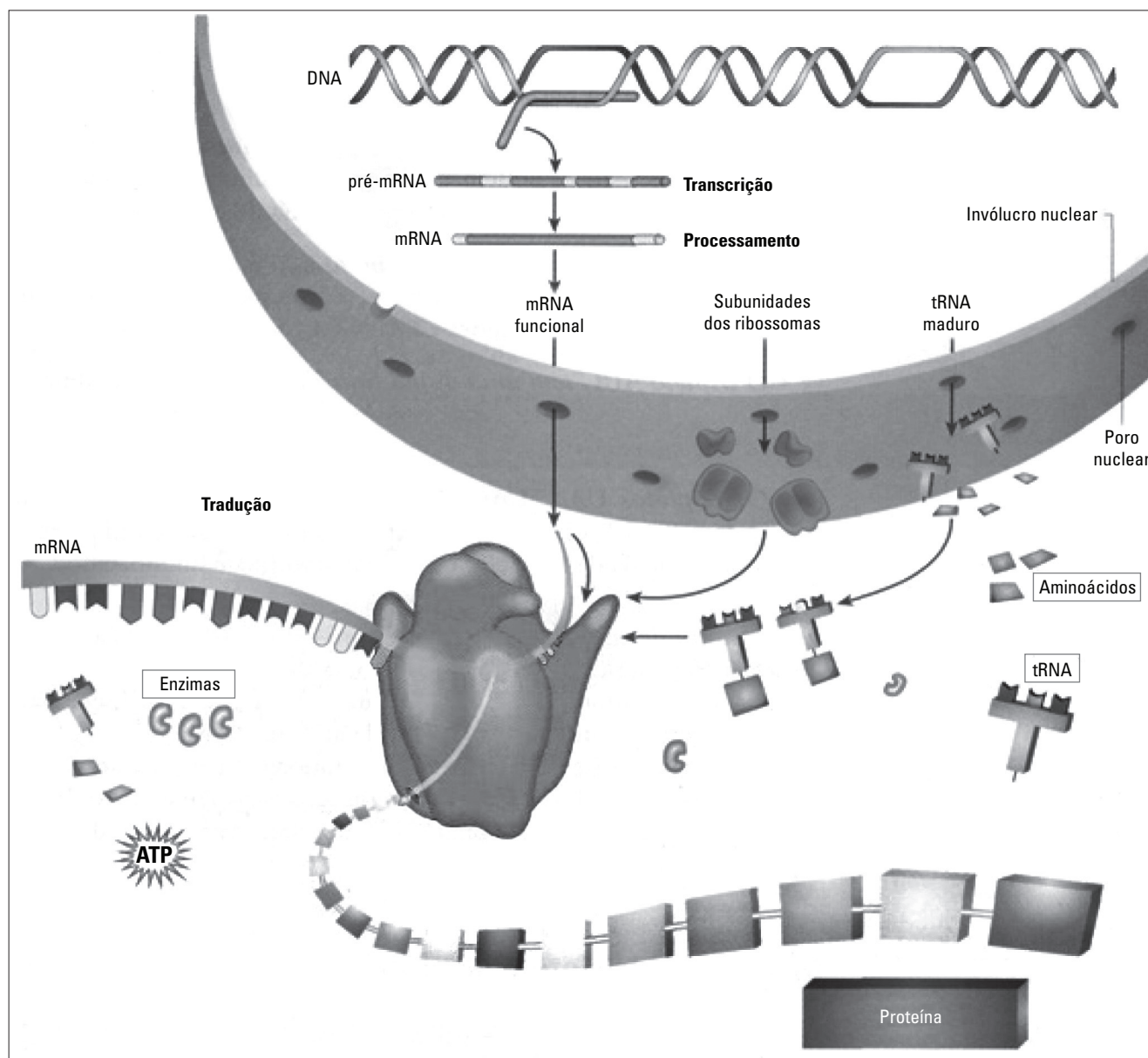



Figura 1.2 Esquema dos processos de transcrição e tradução. Fita de DNA com parte desenovelada sendo transcrita em um pré-RNA mensageiro (pré-RNAm); processamento do pré-RNAm para a produção de um RNAm funcional, o qual segue para o citoplasma; tradução do RNAm sendo realizada no ribossomo; transporte dos aminoácidos pelos RNA transportadores (RNAt) correspondentes aos códons; ligação entre os aminoácidos consecutivos para a produção de uma proteína. **Fonte:** http://11biogeogondomar.blogspot.com.br/2010_09_26_archive.html. Acessado em: 26 jul. 2016.

manutenção da estabilidade e da integridade de cada cromossomo.[7]

Cada espécie possui um complemento cromossômico característico em relação ao número e à morfologia dos cromossomos, conhecido como cariótipo. O genoma humano consiste em 23 pares de cromossomos, sendo 22 pares de autossomos e um par de cromossomos sexuais; dois cromossomos X para as mulheres e um cromossomo X e um Y para os homens.[7] Um membro de cada par dos cromossomos é herdado do pai e o outro da mãe. Como já mencionado, esse material hereditário presente nos cromossomos deve ser transmitido de uma célula para a outra e de uma geração para a outra. Para desempenhar tais funções, as células utilizam dois processos de divisão celular diferentes: a mitose e a meiose.

A mitose é um processo de divisão celular a partir do qual uma célula-mãe dá origem a duas células-filhas idênticas, tanto no número de cromossomos quanto em sua composição genética. Esse tipo de divisão celular ocorre nas células somáticas e é responsável pelo crescimento dos organismos e pela reposição de células mortas. A meiose corresponde a um tipo de divisão celular que origina células-filhas com metade do número de cromossomos da célula mãe, o que corresponde a apenas um par

dos 23 cromossomos (haploide). Esse tipo de divisão celular é importante para a formação dos gametas feminino e masculino, os quais, após se unirem, formam um zigoto com os 23 pares de cromossomos (diploide), mantendo, dessa forma, o número de cromossomos da espécie.[9]

O ciclo celular é um processo contínuo e o tempo de cada ciclo varia entre os diferentes tipos de células. Esse ciclo pode ser dividido em duas principais etapas: a interfase e a mitose. A última corresponde à divisão celular propriamente dita.

A interfase é uma fase do ciclo celular muito ativa, na qual a célula tanto desenvolve todas as suas funções bioquímicas básicas como também prepara todo o material celular, inclusive o DNA, para uma nova mitose. Essa etapa pode ser dividida em três fases: G_1, S e G_2. A fase G_1 é o período que varia muito em relação ao tempo de duração entre os diferentes tipos celulares. Nela, os processos de transcrição e tradução estão ativos, resultando em síntese de grande quantidade de proteínas, as quais também serão importantes para a formação das novas células-filhas resultantes da divisão celular. Na fase S, conhecida por ser a mais importante para a divisão, ocorre a síntese de DNA. Nesse processo, o DNA replica-se dando origem a cromossomos bipartidos, consistindo em duas cromátides irmãs. Por último, a célula entra em G_2, uma fase curta na qual são produzidas mais proteínas e componentes de membranas, que serão utilizados para a formação de novas células.[7]

Ao terminar a fase G_2 da interfase, a célula entra na mitose, que é um processo de divisão celular contínuo, mas que também pode ser didaticamente dividido em quatro fases: prófase, metáfase, anáfase e telófase. Na prófase ocorrem vários eventos: os cromossomos se contraem em uma série de helicoidizações; a membrana nuclear se dissolve; os nucléolos desaparecem; e inicia-se a formação do fuso mitótico. Com o total desaparecimento da membrana nuclear, a célula entra em metáfase, quando os cromossomos atingem a condensação máxima, se localizam no plano equatorial da célula e ficam ligados aos centríolos por meio das fibras do fuso mitótico. A anáfase é a fase na qual o centrômero de cada cromossomo divide-se e as cromátides irmãs dirigem-se para os polos opostos. O processo de divisão celular termina na telófase, uma fase em que vários processos também acontecem: as fibras do fuso mitótico se desintegram; os cromossomos são descondensados; as organelas se distribuem para o citoplasma das duas novas células que estão sendo formadas; formam-se novas membranas nucleares ao redor de cada um dos núcleos filhos; e a célula começa a se dividir. Dessa forma, no fim desse processo, tem-se duas células-filhas que correspondem a cópias idênticas da célula-mãe.[5]

Diferente das células somáticas, as células germinativas precisam passar por um processo de divisão celular em que o número de cromossomos é reduzido pela metade, conhecido como meiose. A meiose, na verdade, refere-se a duas divisões nucleares sucessivas, chamadas de meiose I e meiose II. A meiose I é conhecida como divisão reducional, uma vez que é nessa divisão que o número de cromossomos é reduzido à metade; já a meiose II passa por processos muito semelhantes à mitose.[8]

A meiose I é dividida nas mesmas fases já descritas para a mitose. No entanto, alguns processos de cada uma dessas fases diferenciam muito esses dois tipos de divisão celular, principalmente na prófase. A prófase I pode ser dividida em cinco subfases: leptóteno, zigóteno, paquíteno, diplóteno e diacinese. No leptóteno, assim como na prófase da mitose, os cromossomos já replicados iniciam sua condensação e tornam-se visíveis como filamentos delgados. Na subfase zigóteno, os cromossomos homólogos começam a se parear. Esse pareamento é denominado sinapse. O paquíteno se caracteriza pela maior condensação e pareamento dos cromossomos homólogos e pela ocorrência de *crossing-over* (recombinação gênica). Esse evento envolve a troca de material genético entre dois cromossomos homólogos, sendo essa característica muito importante para a ampliação da diversidade da espécie. No diplóteno, os cromossomos homólogos começam a sofrer repulsão entre si, permanecendo ligados apenas pelos locais onde ocorreu o *crossing-over*, conhecidos como quiasmas. Na diacinese, os cromossomos atingem a condensação máxima, os quiasmas completam o movimento de terminalização e os cromossomos, ainda em pares, começam a se organizar na zona equatorial da célula.[5]

A metáfase I é muito semelhante à metáfase da mitose: a membrana nuclear desaparece, ocorre a formação das fibras do fuso mitótico e os cromossomos se organizam na zona equatorial da célula. No entanto, nessa fase, os cromossomos se encontram em pares e, como consequência, seus centrômeros ficam orientados em direção aos polos diferentes. A anáfase I inicia-se quando os cromossomos homólogos separam-se uns dos outros, orientando-se para os polos opostos. Essa fase se diferencia da anáfase da mitose, principalmente, porque não ocorre separação dos centrômeros, mas dos cromossomos homólogos, em um processo conhecido como disjunção. Como consequência, o número de cromossomos é dividido em partes iguais e o produto dessa divisão é um número haploide de cromossomos.[5]

A meiose I finaliza-se então na telófase I, fase em que os cromossomos atingem os polos opostos da célula e em que ocorre a reconstituição da membrana nuclear. No fim desse processo, as duas células filhas haploides entram na interfase meiótica e imediatamente passam para

meiose II, sem que ocorra síntese de DNA; assim, o estado genético dos cromossomos permanece constante.[7]

A meiose II, como descrito anteriormente, é muito semelhante à mitose. No entanto, nessa divisão celular, a célula já inicia o processo com um número haploide de cromossomos. Como resultado, cada célula que inicia uma meiose finaliza o processo em quatro células-filhas com metade do número de cromossomos da célula-mãe (Figura 1.3).

Uma vez que esses dois processos de divisão celular têm grande importância na garantia da constância do número de cromossomos da espécie, erros em qualquer um deles podem resultar em um indivíduo, ou em uma linhagem celular, com número anormal de cromossomos e, dessa forma, em algum tipo de anormalidade com importância clínica. Erros na disjunção meiótica constituem o mecanismo de mutação mais comum, responsável por defeitos do desenvolvimento, falecimento de recém-nascidos e síndromes relacionadas ao retardo mental. A não disjunção mitótica pode resultar em mosaicismo cromossômico e também pode estar relacionada ao desenvolvimento de alguns tipos de tumores cromossomicamente anormais.[8]

As anormalidades cromossômicas podem ser numéricas e/ou estruturais. As numéricas são as mais comuns, conhecidas como aneuploidias. Entre as aneuploidias mais frequentes, pode-se citar a trissomia do cromossomo 21, que é a constituição cromossômica observada em indivíduos com a síndrome de Down. Entre as outras aneuploidias mais conhecidas, podem ainda ser citadas as trissomias dos cromossomos 13, 18 e dos cromossomos sexuais.

Padrões de herança

O padrão de herança descrito nos trabalhos de Mendel é determinado apenas por um gene – herança monogênica ou herança mendeliana. No entanto, atualmente são conhecidos vários exemplos de características em que esse tipo de herança não se aplica. Tais características são determinadas por mais de um gene, situados em diferentes *loci* e, algumas vezes, até em cromossomos diferentes, sendo, portanto, denominadas como de herança poligênica ou multifatorial.

Além do tipo de herança descrito nos trabalhos de Mendel, existem outros tipos de herança monogênica. Mendel trabalhou em seus experimentos com a herança monogênica autossômica, o que significa que em todos os casos avaliados por ele os genes de interesse estavam em cromossomos autossômicos. No entanto, essa não é a

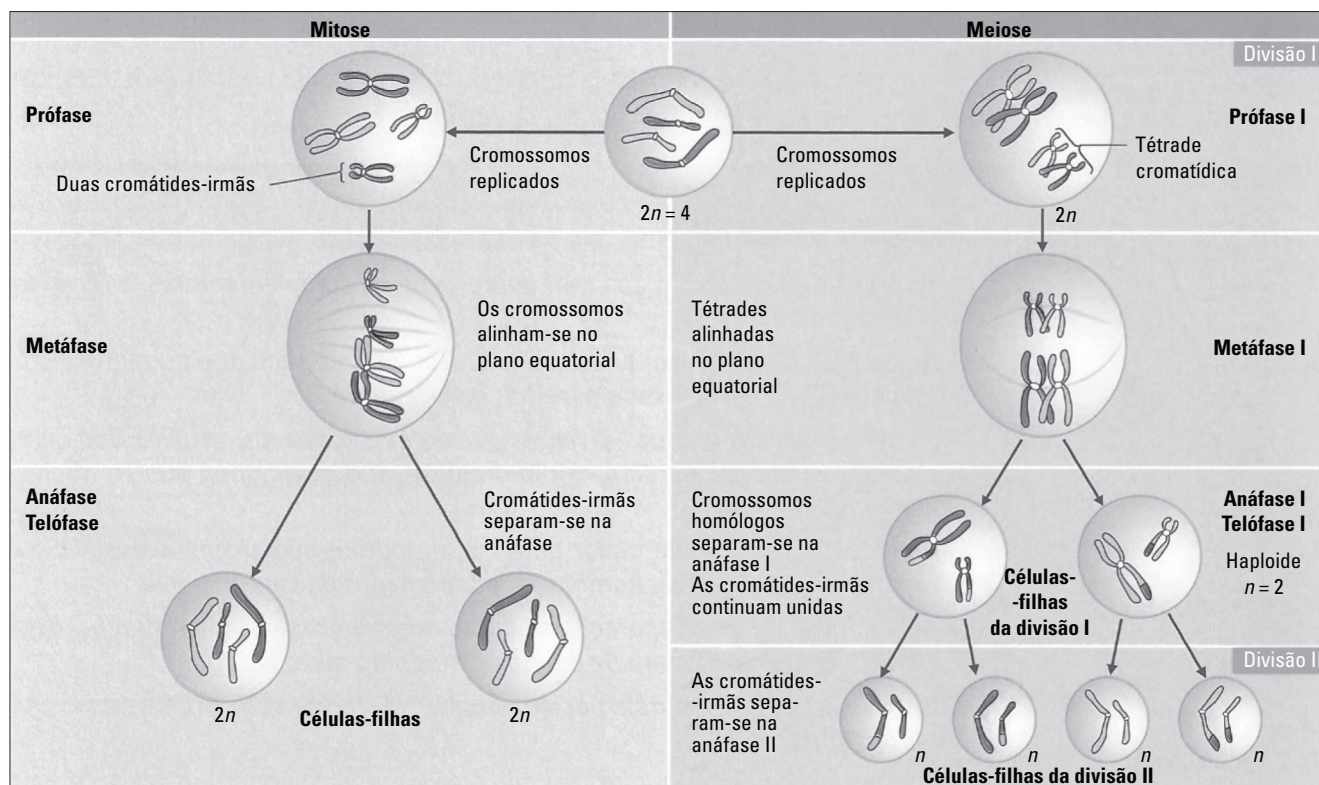



Figura 1.3 Esquema representativo dos processos de divisão celular, mitose e meiose. À esquerda, o processo de mitose começando com uma célula mãe com $2n = 4$ e resultando em duas células filhas idênticas. À direita, a representação da meiose, em duas divisões (meiose I e meiose II). Esse processo começa com uma célula-mãe com $2n = 4$ e finaliza com quatro células-filhas com $2n = 2$. **Fonte:** http://biologia-geologia11a.blogspot.com.br/2010_11_01_archive.html. Acessado em: 26 jul. 2016.

única possibilidade: o gene estudado pode estar localizado em um dos cromossomos sexuais, sendo considerado como ligado ao gênero.

Pode-se classificar as heranças do tipo monogênica em quatro tipos básicos: autossômica dominante, na qual o gene está em um cromossomo autossômico e a característica é expressa mesmo quando o gene está em heterozigose; autossômica recessiva, em que o gene também localiza-se em um cromossomo autossômico, mas a característica só é expressa quando o gene está em dose dupla (homozigose); e, quando essas duas formas ocorrem em cromossomos sexuais, a herança pode ser dominante ligada ao gênero e recessiva ligada ao gênero, respectivamente. Os termos dominante e recessivo não se referem aos genes, mas às características.[7]

Para estudos de herança em humanos, é necessário o exame de registros da família estudada. Esse exame de registros é utilizado para a montagem da genealogia ou heredograma da família. A montagem desses heredogramas deve ser cuidadosa, fidedigna e com maior número de informações possíveis. Além disso, deve seguir regras para a utilização dos símbolos, a fim de facilitar a identificação do tipo de herança que está sendo avaliada.[5]

Herança autossômica recessiva

Este tipo de herança é bem caracterizada em casos de doença autossômica recessiva, pois somente se manifesta em homozigose, ou seja, em indivíduos com dois alelos mutados. Considerando que para o indivíduo carrear os dois alelos mutados é necessário que tenha herdado cada um dos diferentes genitores, e verificando que as doenças autossômicas recessivas são geralmente raras, o tipo de casamento mais provável para gerar tal prole afetada é entre dois indivíduos normais, mas heterozigotos para essa doença.[9]

Indivíduos heterozigotos para um gene recessivo são saudáveis (portadores), independentemente da letalidade daquele gene no estado homozigótico. Assim, a maioria dos genes recessivos em uma população está "escondida" em indivíduos portadores. Estima-se que cada indivíduo é portador de três a cinco alelos mutantes que seriam letais em homozigose. Entretanto, a frequência de doenças recessivas mantém-se baixa na população porque, para que um portador tenha um filho homozigoto, é necessário que o seu consorte também seja portador. Se o consorte não for consanguíneo, a probabilidade de que isso aconteça dependerá da frequência do alelo específico, mas, em geral, será muito baixa. Por outro lado, se o consorte for consanguíneo, a probabilidade que ele também seja portador é considerável.[8]

Algumas características definem um heredograma de uma doença autossômica recessiva: geralmente poucos indivíduos afetados (condição rara, pois a maioria das pessoas carreadoras do alelo alterado está em heterozigose); igualmente observada em homens e mulheres; pessoas afetadas geralmente têm genitores normais (heterozigotos); os genitores dos afetados são geralmente consanguíneos.[5]

Entre as doenças humanas autossômicas recessivas, pode-se citar a fibrose cística, uma das mais graves condições autossômicas recessivas, que é uma doença pulmonar crônica em que o principal sintoma é a secreção de grande quantidade de muco nos pulmões; o albinismo, caracterizado pela ausência de pigmentação na pele, cabelos e olhos, defeitos oculares e rubor intenso decorrente de exposição ao sol; e o hipotireoidismo, que consiste em insuficiência funcional da tireoide.[5,8]

Herança autossômica dominante

Nesse caso, o alelo normal é recessivo e o alelo mutado é dominante. Quando a característica é comum, qualquer genótipo é igualmente provável. No entanto, se é uma doença rara, nem todos os tipos de genótipos serão frequentes, sendo pouco provável que os indivíduos afetados sejam homozigotos. Alguns critérios auxiliam no reconhecimento da herança autossômica dominante: o fenótipo afetado ocorre em todas as gerações; para que um filho seja afetado, é necessário que um dos pais também seja; aparecem em ambos os gêneros na mesma frequência.[8]

Mais da metade de todos os distúrbios mendelianos humanos é herdada como herança autossômica dominante. A acondroplasia, o tipo mais comum de nanismo, é um dos principais exemplos de doença autossômica dominante. Outro exemplo desse tipo de herança é a doença de Huntington, que ocorre em razão de uma degeneração neural e se caracteriza por movimentos corporais anormais, falta de coordenação e habilidades mentais afetadas.[5,8]

Herança ligada ao gênero

A herança ligada ao gênero é determinada por genes situados nos cromossomos sexuais, X e Y. No entanto, o cromossomo Y apresenta poucos genes e, dessa forma, quando é referida herança ligada ao gênero, geralmente refere-se àquela ligada ao X. Uma vez que esses cromossomos são desigualmente distribuídos entre homens e mulheres, sendo os homens XY e as mulheres XX, três genótipos são possíveis para as mulheres, enquanto só dois são possíveis para os homens, e estes, por sua vez, por possuírem apenas um cromossomo X, são denominados hemizigotos.[9]

Assim como na herança autossômica, a herança ligada ao X pode ser dominante ou recessiva. Essas duas formas são diferenciadas de acordo com o fenótipo das mulheres heterozigotas, ou seja, de acordo com a penetrância e a expressividade. Penetrância refere-se à capacidade que determinado genótipo tem de se manifestar em seus portadores. Expressividade corresponde ao modo de expressão do alelo, com maior ou menor intensidade. No entanto, essa distinção nem sempre é fácil, em razão do processo de inativação aleatória do cromossomo X em mulheres. Nesse processo, um dos cromossomos X é parcialmente inativado de forma irreversível e clonal, ou seja, a partir do momento em que um dos dois cromossomos X é inativado em uma célula, todas as células descendentes dela terão o mesmo cromossomo X inativado.[7]

No caso de herança recessiva ligada ao X, o alelo referente à característica estudada exibe pouca ou nenhuma penetrância. Dessa forma, para que uma mulher seja portadora, é necessário que tenha esse alelo nos dois cromossomos X; já para o homem, a presença de um único alelo é determinante para a expressão de tal característica. Como consequência, doenças com esse tipo de herança geralmente são restritas aos homens, sendo raramente identificadas em mulheres. Entre as outras características desse tipo de herança destaca-se o fato de nenhum homem afetado transmitir a doença para seus filhos homens e todas as filhas de um homem afetado serem portadoras do alelo em questão. Entre as doenças humanas desse tipo de herança destacam-se a distrofia muscular duchenne (DMD), a hemofilia e o daltonismo.[5] Outras doenças autossomicas recessivas ligadas ao X incluem a hipofosfatemia, um tipo de raquitismo resistente à vitamina D e a síndrome do X frágil, um dos tipos mais comuns de retardo mental.[7]

Princípios básicos da genética de populações

Depois de entender o que é um gene e como ele pode ser herdado, é importante compreender como eles estão distribuídos em uma população. Uma parte importante do estudo da genética é a determinação das frequências gênicas, genotípicas e fenotípicas dos indivíduos e das populações. Esse ramo da genética é conhecido como genética de populações e estuda como os genes estão distribuídos na população, bem como os fatores que interferem nessa distribuição.

A genética de populações permite estudar a frequência genotípica de determinada população e, a partir dela, estimar a frequência alélica. Em determinados casos, como será visto a seguir, o inverso também é possível, ou seja, estimar a frequência genotípica a partir da frequência alélica. Esse tipo de estudo é de extrema importância para a genética de populações humanas, pois permite compreender como a frequência das doenças hereditárias se mantém nas populações, assim como facilita os processos de aconselhamento genético, para auxiliar pais que pretendem saber a possibilidade de gerar um filho afetado com relação a determinada doença.

Modelo para um gene

A genética de populações procura entender, principalmente, a frequência gênica e genotípica de determinada característica estudada. Para facilitar o exemplo de como realizar esse cálculo, aqui avalia-se determinado gene com dois alelos diferentes e, consequentemente, três possibilidades genotípicas, "AA", "Aa" e "aa". Nesse caso, pode-se definir que a frequência genotípica de cada um dos genótipos é AA = P, Aa = Q e aa = R, lembrando que P, Q e R são expressos em porcentagens ou proporções, e a soma dos três deve sempre ser igual a 1 ou 100%.[11]

Conhecendo a frequência genotípica, a frequência gênica pode ser facilmente determinada. Considerando o alelo "A" como "p" e o alelo "a" como "q", pode-se chegar à frequência de cada um destes da seguinte forma: $p = P + ½ Q$ e $q = R + ½ Q$. Vale lembrar que $p + q$ também deve ser igual a 1. Apesar da possibilidade de calcular a frequência gênica ou alélica pela frequência genotípica, o oposto nem sempre é possível, a não ser que a população esteja em equilíbrio de Hardy-Weinberg, quando há uma simples relação matemática que permite calcular a frequência genotípica a partir da frequência alélica.[11] Em 1908, o matemático inglês Godfrey H. Hardy e o médico alemão Wilhem Weinberg concluíram que, se nenhum fator evolutivo atuasse sobre uma população que satisfizesse certas condições, as frequências de seus alelos permaneceriam inalteradas ao longo das gerações. Esse princípio ficou conhecido como lei ou teoria de Hardy-Weinberg.[11]

Para que uma população esteja em equilíbrio de Hardy-Weinberg, é necessário que obedeça as seguintes condições: deve ser grande o suficiente e deve apresentar uma relação 1:1 de machos e fêmeas, para que os acasalamentos ocorram de forma aleatória; ausência de seleção para qualquer um dos alelos em estudo; ausência de imigração de indivíduos de outras populações com frequência gênica diferente; e ausência de mutação em taxas apreciáveis.[5]

Para uma população que obedeça todas essas condições existe uma única relação entre a frequência de alelos e a frequência de cada genótipo: $AA = p^2$; $Aa = 2pq$; e $aa = q^2$, que corresponde à probabilidade de cada um desses alelos se combinar em acasalamentos aleatórios, onde $p^2 + 2pq + q^2 = 1$. Uma vez que a população tenha entrado nesse equilíbrio e caso nenhum dos fatores inter-

ferentes ocorra, a frequência genotípica permanecerá constante de geração em geração.[7]

Modelo para dois genes

O caso ilustrado anteriormente é o modelo mais simples para estudo de frequência alélica e genotípica – um gene com dois alelos. No entanto, às vezes é necessário avaliar no mesmo estudo a frequência de dois genes diferentes, principalmente quando esses genes estão ligados. Para entender como se faz esse tipo de estudo, é necessário, em primeiro lugar, compreender a definição de haplótipo, que nesse caso corresponde à combinação de alelos em mais de um *loci*. Nos casos em que se estuda a frequência dos alelos de mais de um gene, em vez de tratar sobre frequência alélica ou frequência gênica, será caracterizada a frequência haplotípica. No caso de dois genes com dois alelos cada (A e a; B e b), quatro haplótipos são possíveis (AB, Ab, aB e ab).[11]

De acordo com a Segunda Lei de Mendel, dois genes se segregam de forma independente para a formação dos gametas. No entanto, à medida que novos testes de cruzamentos foram realizados por outros pesquisadores, utilizando a própria ervilha como modelo ou outros organismos como a *Drosophila*, foram observados resultados que se diferenciavam muito das proporções esperadas.[5]

Com base nesses resultados e com o conhecimento de todo o processo de divisão celular, foi possível observar que a lei de segregação independente se aplica a genes localizados em cromossomos diferentes ou, quando localizados no mesmo cromossomo, em uma distância que permita uma grande quantidade de recombinação ou *crossing-over*. Portanto, quando dois genes estiverem no mesmo cromossomo e muito próximos, sua segregação não será independente; eles serão caracterizados como ligados e, desse modo, sempre serão transmitidos juntos para os gametas.[8]

Para avaliar a distância entre dois genes ou o quanto esses genes estão ligados, deve-se determinar a frequência de recombinação. Se dois genes são sempre transmitidos juntos para a próxima geração, não ocorrendo nenhum processo de recombinação, serão considerados fortemente ligados. No entanto, se o processo de recombinação alcançar os 50%, de modo que a probabilidade de AB ou ab serem transmitidos juntos seja igual à de Ab ou aB, então esses genes não estão ligados e se distribuem de forma independente. Ainda existem diversos graus de ligação entre esses dois extremos; pode ser, por exemplo, de 70%, o que significa 30% de recombinação entre os genes.[7]

A ligação, como visto até agora, pode estar em acoplamento, ou em *cis*, quando os genes A e B estão localizados no mesmo cromossomo, ou podem estar ligados em repulsão, ou *trans*, quando A e B estão em cromossomos diferentes. Por exemplo, se A e B têm aparecido juntos com maior frequência na prole, diz-se que eles estão em *cis*, ou seja, no mesmo cromossomo. No entanto, se a prole tem maior quantidade de Ab, por exemplo, significa que A e B estão em cromossomos diferentes, ou seja, estão em *trans*.[9]

Com base nas informações da ligação dos genes, pode-se também determinar dois termos comuns à genética: o equilíbrio de ligação e o desequilíbrio de ligação. O termo equilíbrio de ligação se aplica nos casos em que a frequência de cada alelo dentro dos haplótipos é igual à frequência daquele alelo na população geral; já o desequilíbrio de ligação ocorre quando há associação não aleatória de alelos em *loci* ligados.[11]

Para tornar mais claros esses dois termos, é necessário exemplificar. Em determinado estudo estão sendo avaliados dois genes diferentes com dois possíveis alelos cada, um gene referente a determinada doença (A e a) e outro ligado a esse, que será o gene marcador (B e b). Considere que os alelos B e b estão, cada um, em uma frequência de 50% na população e que, para o gene da doença, o alelo "A" esteja em uma frequência de 80% e o alelo "a", de apenas de 20%. Conhecendo a frequência de cada alelo, deve-se identificar como esses alelos estão distribuídos nos quatro haplótipos possíveis. Caso 10% dos alelos de "a" estejam com o alelo marcador B e outros 10% desse alelo estejam com o alelo marcador 'b' e, consequentemente, o alelo A também esteja igualmente distribuído entre B e b, diz-se que essa população está em equilíbrio de ligação.

No entanto, quando *loci* muito próximos estão sendo avaliados, esse equilíbrio nem sempre é observado. Supondo outro quadro, no qual todos os alelos "a" são herdados juntamente com o alelo "B" e nenhum com o alelo "b". Diz-se, então, que aB está em forte desequilíbrio de ligação. O desequilíbrio de ligação é, portanto, uma propriedade de haplótipos, não dos genótipos, e funciona como uma analogia para o sistema de dois *loci* do equilíbrio de Hardy-Weinberg para o sistema de um *locus*.[7]

Avaliando o mapa de ligação dos genes humanos, percebe-se que, enquanto a maioria dos genes é distribuída aleatoriamente ao longo de todos os cromossomos, existem alguns *clusters* de genes proximamente localizados. Esses *clusters* podem ser de genes que pertencem à mesma família ou que desempenham funções relacionadas, como os genes das hemoglobinas, os quais estão proximamente ligados.[11]

O estudo da ligação entre genes tem grande importância na genética humana e médica, no auxílio da identificação, do mapeamento e, consequentemente, no diagnóstico

de genes responsáveis por doenças hereditárias. O projeto HapMap, criado a partir do sequenciamento do genoma humano, tem como principal objetivo criar um mapa de haplótipos e, dessa forma, fornecer uma ferramenta poderosa para localizar as variantes genéticas que contribuem para as diferentes doenças humanas poligênicas.

Genética da população brasileira

Populações de diferentes partes do mundo variam consideravelmente na predisposição às doenças e na frequência alélica de *loci* relacionados às características de interesse clínico. Essas diferenças podem ser resultado de deriva genética e/ou adaptação aos fatores seletivos de cada local.[13] Nesse contexto, a população brasileira é uma das mais heterogêneas do mundo. Além da sua grande extensão, da diversidade climática e de outras condições ambientais, o Brasil passou por um longo processo de miscigenação de pessoas provenientes de três diferentes populações: ameríndios, europeus e africanos.[14]

De acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no ano de 1500 o Brasil era habitado por aproximadamente 2,4 milhões de ameríndios. Com o processo de colonização, estima-se que o Brasil tenha recebido aproximadamente 4 milhões de escravos africanos e 6 milhões de imigrantes europeus.[16,17] Com o intuito de entender a composição genética da atual população brasileira, muitos autores têm avaliado a contribuição de cada uma dessas populações responsáveis pela formação da nossa população.

Vários marcadores moleculares têm sido utilizados para caracterizar a ancestralidade e a formação da população brasileira. Entre eles, podem ser citados polimorfismos na porção não recombinante do cromossomo Y, utilizados para investigar a contribuição de linhagens patrilineares distintas na população brasileira;[15] DNA mitocondrial (DNAmt) para avaliar as linhagens matrilineares nas diferentes regiões brasileiras;[17] e um painel de 40 polimorfismos de inserção/deleção, informativos de ancestralidade, aplicado para brasileiros de diferentes regiões do país.[13]

Os polimorfismos do DNAmt apresentam propriedades únicas que os tornam especialmente úteis para reconstruções genealógicas. Em primeiro lugar, o DNAmt é herdado exclusivamente do óvulo materno, tendo assim herança matrilinear. Em segundo lugar, não troca genes com nenhum outro segmento genômico, sendo transmitido às gerações seguintes como *loci* de genes, permanecendo inalterados até que ocorra uma mutação. Assim, o DNAmt fornece informações que permitem traçar matrilinhagens que alcançam dezenas de gerações no passado. No entanto, para estabelecer a ancestralidade paterna, deve ser feito o uso do alto poder de resolução de perfis genéticos do cromossomo Y humano, que é passado de pai para filho, para traçar linhagens patrilineares que alcançam dezenas de gerações no passado. Por último, os polimorfismos em cromossomos autossômicos são ótimos marcadores de individualidade. Em razão da recombinação, cada um dos cromossomos autossômicos tem segmentos herdados de praticamente todos os antepassados.

Os resultados que emergem desses diferentes trabalhos refletem a grande heterogeneidade em relação à ancestralidade da população brasileira, tanto em nível individual quanto de grupos. Essa heterogeneidade foi observada independentemente da etnia do indivíduo, como também da sua origem geográfica.[13] A partir dos dados obtidos por análises do cromossomo Y, foi possível observar que homens brasileiros têm grande parte de seus marcadores indicando origem europeia, uma baixa frequência de origem africana e ausência de contribuição ameríndia.[15] No entanto, dados a partir do DNAmt resultaram em 39% de ancestralidade europeia, 33% ameríndia e 28% africana.[18] Esses dados revelam que o genoma de muitos brasileiros é um mosaico, tendo o DNAmt e o cromossomo Y de diferentes origens filogeográficas.[14]

Em razão dessa alta variabilidade de ancestralidade entre os brasileiros, pode-se concluir que cada indivíduo brasileiro apresenta uma proporção individual e única de ancestralidade europeia, africana e ameríndia no seu genoma mosaico. Dessa forma, o Brasil se torna um bom modelo para o estudo da genética de populações miscigenadas, em que as pessoas não podem ser avaliadas como membros de um grupo, mas como pessoas individuais com genoma e história de vida única.[14]

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A genética é uma ciência relativamente nova, mas que vem crescendo e evoluindo constantemente. O surgimento de novas técnicas moleculares e o aperfeiçoamento daquelas já existentes têm permitido estudos mais precisos de características de interesse. As várias metodologias de estudo de polimorfismos de DNA já desenvolvidas possibilitam que os laboratórios especializados em genética possam escolher a técnica mais adequada para analisar e elucidar um tipo de problema específico.[1] No entanto, o conhecimento da genética básica, de como essas características são herdadas, da base molecular da herança e de como as características estão distribuídas tem sido de fundamental importância para melhor compreensão das descobertas e dos avanços que essas novas técnicas têm permitido.

Nesse contexto, a medicina genômica e todas as suas ramificações nascem entre o paradigma de saúde e doença, pois já se sabe que, conhecendo a intimidade das varia-

ções genéticas que determinam predisposições e resistências ao surgimento de doenças crônicas não transmissíveis, é possível manipular o ambiente (principalmente estilo de vida e alimentação) a fim de manter o equilíbrio metabólico que caracteriza a saúde.[1]

REFERÊNCIAS

1. Pena SDJ. Medicina genômica personalizada aqui e agora. Rev Med Minas Gerais. 2010;20(3):329-34.
2. Mutch DM, Wahli W, Williamson G. Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of nutrition. The Faseb Journal. 2005;19:1602-16.
3. Kaput J. Nutrigenomics research for personalized nutrition and medicine. Current Opinion in Biotechnology. 2008;19:110-20.
4. Hausmann R. História da biologia molecular. Tradução: Celma Hausmann. 2.ed. Ribeirão Preto: Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto; 2002. 295p.
5. Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM. Introdução à genética. Tradução: Paulo Armando Motta. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. 794p.
6. Keller EF. O século do gene. Tradução: Nelson Vaz. Belo Horizonte: Crisália; 2002. 204p.
7. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Thompson & Thompson genética médica. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2007. 525p.
8. Speicher MR, Antonarakis SE, Motulsky AG. Vogel and Motulsky's human genetics, problems and approaches. 4.ed. Berlim: Springer-Verlag; 2009. 981p.
9. Borges-Osório MR, Robison WM. Genética Humana. 2.ed. Porto Alegre: Artmed; 2002. 459p.
10. Lewin P. Genes IX. Tradução: Andréa Maranhão, Cynthia Kyaw, Ildinete Pereira, Marcelo Brígido e Marcio Fonseca. 9.ed. Porto Alegre: Artmed; 2009. 912p.
11. Ridley M. Evolução. Tradução: Henrique Ferreira, Luciane Passaglia e Rivo Fischer. 3.ed. Porto Alegre: Artmed; 2006. 752p.
12. Edwards AWF. G.H. Hardy (1908) and Hardy-Weinberg Equilibrium. Genetics. 2008;179:1143-150.
13. Pena SDJ, Pietro GD, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy FSG et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. Plos One. 2011;6(2):e17063.
14. Pena SDJ, Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR, Bydlowski SP. DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians. Braz J Med Biol Res. 2009;42;870-76.
15. Carvalho-Silva DR, Santos FR, Rocha J, Pena SDJ. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. Am J Human Genetics. 2001;68:281-86.
16. Ribeiro D. O povo brasileiro: a formação e o sentido do Brasil. São Paulo: Companhia de Letras; 1995.
17. Alves-Silva J, Santos MS, Guimarães PEM, Ferreira ACS, Bandelt HJ, Pena SDJ et al. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. Am J Genetics. 2000;67:444-61.

2 | Expressão gênica

Silvana Auxiliadora Bordin da Silva
Lucas Carminatti Pantaleão

INTRODUÇÃO

O biólogo americano James Watson e o físico inglês Francis Crick elucidaram a estrutura em alfa-hélice do ácido desoxirribonucleico (DNA) na década de 1950, o que é considerado um marco para a biologia molecular. Entretanto, a molécula de DNA foi identificada mais de 50 anos antes pelo químico suíço Friedrich Miescher, que descobriu que as células tinham núcleo, e denominou seu conteúdo de nucleína, o que, após algum tempo, passou a ser conhecido como DNA. Anos mais tarde, vários cientistas – em especial Phoebus Levene e Erwin Chargaff – revelaram detalhes adicionais da molécula, como seus componentes químicos e suas ligações. Esses resultados foram fundamentais para que Watson e Crick demonstrassem, em 1953, que a molécula de DNA existe na forma de dupla hélice.[1]

Em 1956, Francis Crick publicou um artigo intitulado *Ideas on Protein Synthesis*,[2] no qual propunha a teoria de que as proteínas eram sintetizadas a partir de moldes, um para cada proteína. Os moldes seriam os genes. Nesse artigo, dirigido tanto ao público geral quanto aos cientistas, Crick propôs o que denominou de *dogma central*. A teoria explicava a maioria dos resultados experimentais obtidos na época. O dogma central previa que, uma vez que a "informação" se tornasse proteína, esta não poderia ser revertida. As moléculas que carregam a informação – os moldes – são exclusivamente DNA (os genes) e ácido ribonucleico (RNA, os transcritos). Em outras palavras, o fluxo da informação genética é sempre na direção de DNA ou RNA para proteína, mas nunca de proteína para DNA ou RNA. Embora nos dias atuais a teoria de Crick pareça óbvia, sua descoberta alterou permanentemente a lógica da biologia.[3,4]

Geralmente encontra-se o dogma simplificado como *DNA → RNA → proteína*. Essa simplificação indica que a dupla hélice de DNA fornece tanto o molde quanto a estocagem da informação. Mecanismos celulares de transcrição e tradução utilizam a informação codificada no DNA para produzir as proteínas que definirão o fenótipo e as funções celulares. Atualmente, sabe-se que o dogma central é muito mais complexo e os avanços no desenvolvimento de técnicas de biologia molecular têm possibilitado a elucidação tanto da estrutura de genes quanto da regulação da expressão gênica, temas que serão abordados neste capítulo.

ESTRUTURA DO DNA E DOS GENES

A elucidação da estrutura tridimensional foi o ponto de partida para a compreensão do funcionamento do DNA. Após a descoberta da estrutura molecular da dupla hélice de DNA, os cientistas perceberam que, para entender as bases moleculares da vida, o próximo desafio seria desvendar a estrutura e as propriedades do RNA.

Nos próximos tópicos, será apresentado o mecanismo geral pelo qual a informação armazenada em um gene é transformada em moléculas capazes de direcionar as atividades celulares. Para tanto, faz-se necessária a definição de algumas estruturas funcionais básicas.

DNA

É a molécula que codifica as instruções (informações genéticas) utilizadas no desenvolvimento e no funcionamento de todos os organismos vivos e de muitos vírus. A maior parte das moléculas de DNA consiste em duas fitas de polímeros de unidades básicas (nucleotídeos), enroladas e ligadas entre si por pontes de hidrogênio. Cada nu-

cleotídeo é composto de uma base nitrogenada aromática – guanina (G), adenina (A), timina (T) ou citosina (C) – e uma molécula do monossacarídeo desoxirribose, ligada a um radical fosfato. O açúcar se liga ao fosfato no carbono 5' e ao nucleotídeo no carbono 1'. Em razão da especificidade da polimerase de adicionar novos nucleotídeos ao radical hidroxila do carbono 3', a nomenclatura química dos átomos de carbono do anel aromático do açúcar define a direcionalidade do DNA. Assim, os polímeros de cada fita só podem ser sintetizados *in vivo* na direção 5' para 3'; o nucleotídeo a montante é denominado 5' e o nucleotídeo a jusante, 3' (pronuncia-se "cinco linha" e "três linha", respectivamente). O pareamento entre as fitas se dá pela ligação não covalente entre A e T (por duas pontes de hidrogênio) e G e C (por três pontes de hidrogênio) (Figura 2.1). Pode-se dizer, de maneira

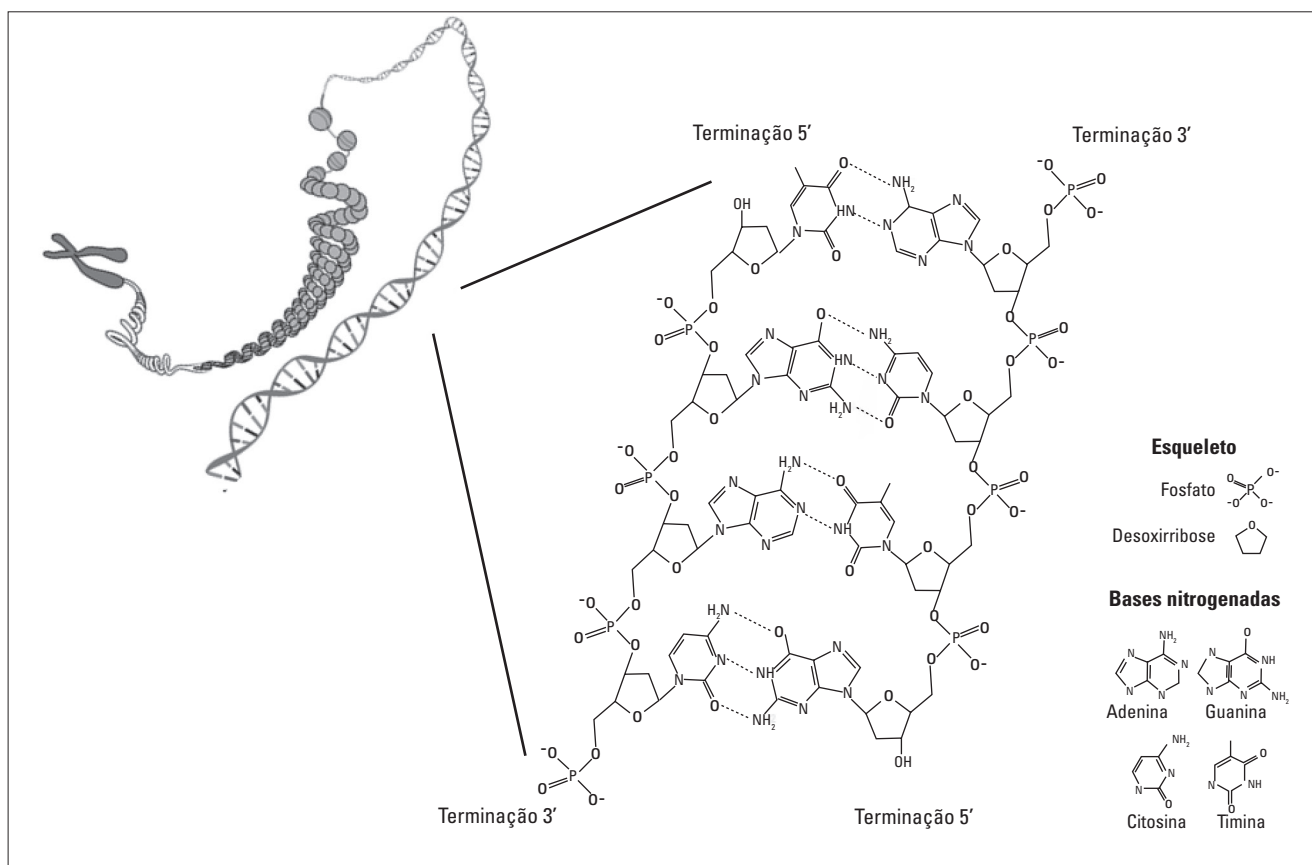



Figura 2.1 Estrutura e composição do DNA. **Fonte:** adaptada de Alberts et al.[5]

simplificada, que cada cromossomo é uma longa molécula de DNA associada a proteínas histonas.

Histonas

São proteínas que formam um octâmero a partir de duas unidades de cada uma das quatro histonas principais (H2A, H2B, H3, H4), as quais funcionam como a matriz na qual o DNA dá cerca de duas voltas, formando os nucleossomos. Os nucleossomos, por sua vez, são interligados pela histona H1, uma proteína de ligação encontrada fora do octâmero de histonas e que se liga ao DNA nos pontos de entrada e de saída do nucleossomo. Essa interação possibilita o empacotamento da cromatina e, consequentemente, permite que os genomas eucarióticos de grandes dimensões caibam dentro do núcleo das células. As histonas podem sofrer modificações pós-traducionais e, dessa forma, desempenham papel fundamental na expressão gênica, por meio de mecanismos epigenéticos.[5]

Cromatina

É o complexo de macromoléculas composto de DNA, RNA e histonas que é formado no núcleo das células em interfase. Em razão de sua organização compacta, os cromossomos individuais não são prontamente identificados e a maior parte das sequências de DNA está estruturalmente inacessível e funcionalmente inativa. A subunidade fundamental da cromatina é o nucleossomo, que corres-

ponde a uma sequência de cerca de 200 nucleotídeos enovelados em um octâmero de histonas, o que resulta em empacotamento do DNA e em redução do volume para uma taxa seis vezes menor que a dupla hélice livre de histonas. O segundo nível de organização da cromatina é o enovelamento em hélice dos nucleossomos, formando uma estrutura na forma de fibra. A formação das fibras atinge a taxa de empacotamento de cerca de 40 vezes. Por fim, as fibras são também empacotadas, resultando no terceiro nível de empacotamento, que atinge a taxa de 1.000 vezes para a eucromatina (menos condensada) e 10.000 vezes para a heterocromatina (regiões do genoma altamente condensadas). Além de sua função primordial de reduzir o volume do DNA para que se ajuste ao volume celular, a cromatina previne os danos no DNA, facilita a mitose e controla a expressão gênica.[6]

Gene

É um segmento do DNA com localização cromossômica específica (*locus*) que representa a unidade molecular da hereditariedade dos organismos. Também denominado *cistron*, um gene tem como função primária codificar uma cadeia polipeptídica, mas pode também codificar sequências funcionais que são transcritas em diferentes tipos de RNA que não traduzem proteínas. Uma variante de sequência de DNA similar localizada em um *locus* específico é denominada alelo. O mapeamento genético é o processo de determinação do *locus* relacionado a um traço biológico particular.

A estrutura geral de um gene de eucariotos está representada na Figura 2.2, na qual é possível observar quatro regiões funcionais básicas: região a montante não traduzida (5'-UTR; *5' untranslated region*), éxons, íntrons e região a jusante não traduzida (3'-UTR; *3' untranslated region*). No contexto de estudos genéticos e de biologia molecular, tradução é o processo pelo qual os ribossomos sintetizam proteínas a partir do molde de RNA mensageiro (RNAm). Éxon é qualquer segmento de um gene que é representado no RNAm maduro. Íntron é um segmento que é transcrito em RNA primário, mas que é removido para a formação do RNAm maduro. Cerca de 97% dos genes humanos possuem íntrons, e apenas 3% apresentam sequência de DNA idêntica ao transcrito maduro (isto é, são genes sem íntrons). De forma contrária, a maioria dos genes de procariotos não possui íntrons.

As porções 5'-UTR e 3'-UTR de um gene têm função regulatória e estrutura mais complexa. Todos os genes possuem regiões regulatórias, e as localizadas na porção 5'-UTR são as responsáveis pelo início da transcrição. A montante do sítio de iniciação da transcrição existem diferentes combinações de sequências específicas do DNA, cada uma reconhecida por sua proteína

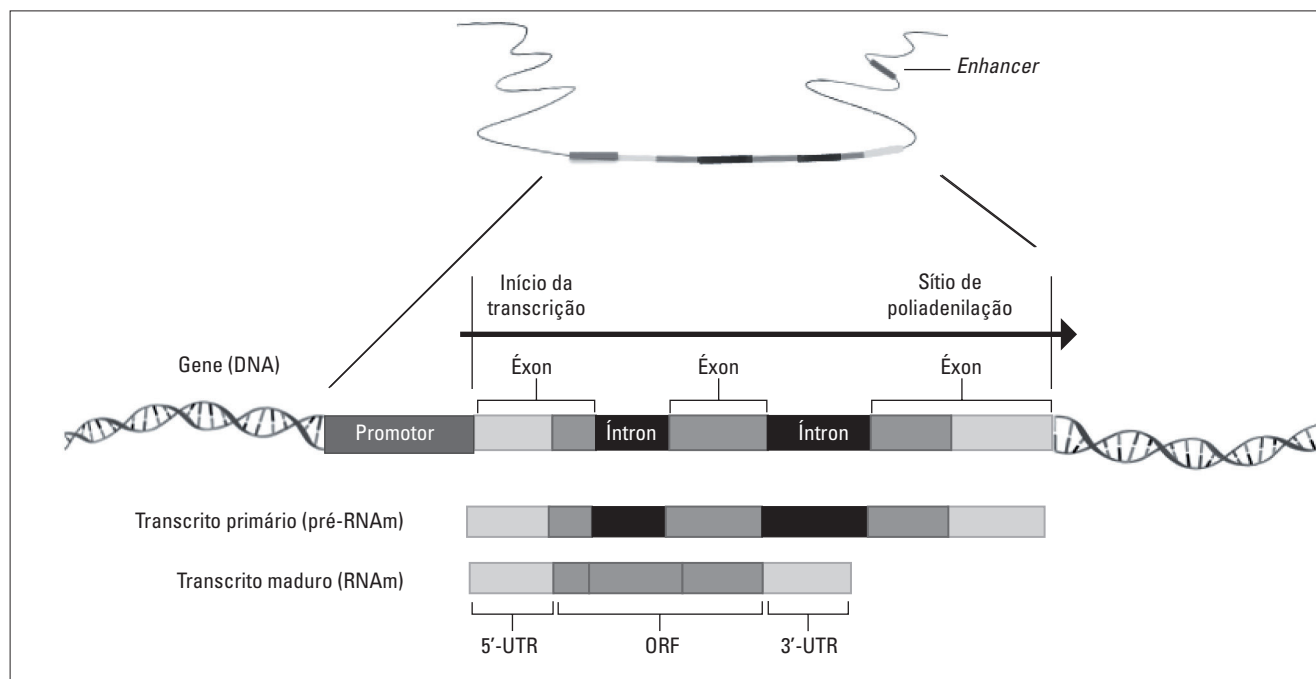



Figura 2.2 Estrutura geral de um gene de eucariotos. Na ilustração hipotética, o gene é composto de três éxons e dois íntrons. O transcrito primário (RNAm) é composto de éxons e íntrons, ou seja, regiões codificadoras e não codificadoras de proteínas, respectivamente. Já o transcrito maduro é formado a partir do processo de *splicing,* no qual há retirada dos íntrons, restando a região codificadora (ORF, *open reading frame*), a região 5'-UTR e a região 3'-UTR. **Fonte:** adaptada de Alberts et al.[5]

correspondente de ligação ao DNA. Essas proteínas são denominadas fatores de transcrição. Cada combinação de sequência de DNA e fator de transcrição cognato constitui um módulo de controle. A essência da regulação transcricional de eucariotos é usar diferentes combinações de um grande número de módulos de controle para a regulação da expressão de cada gene.[7]

Os segmentos de DNA de cada módulo de controle podem ser divididos em três regiões principais: elementos promotores centrais ou basais, elementos promotores proximais e elementos promotores distais (*enhancers*) (Figura 2.3). Outros elementos também podem participar da regulação da transcrição; por exemplo, sequências de DNA que definem segmentos distintos e limitam a região de ativação da cromatina – denominadas *insulators*

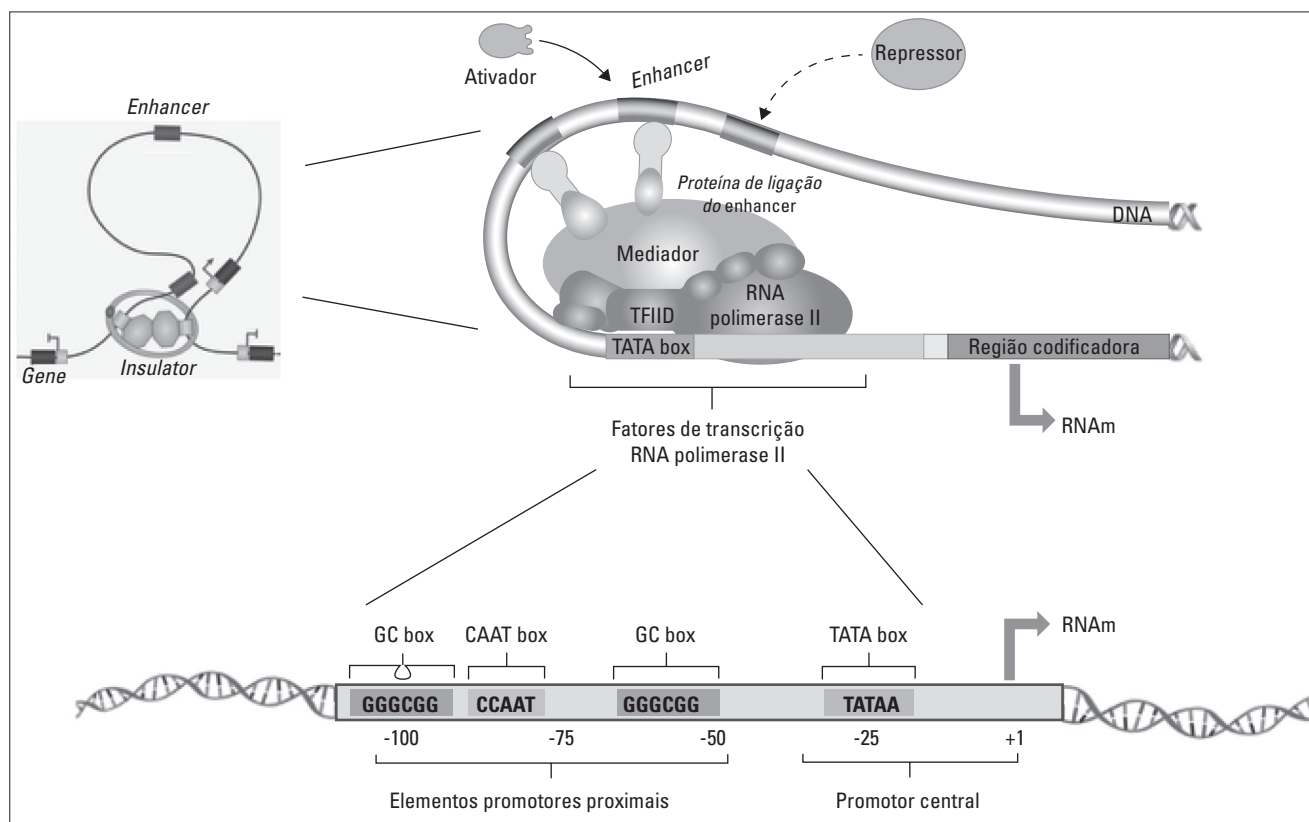



Figura 2.3 Ilustração hipotética de localização e composição das regiões regulatórias de um gene. A figura destaca a localização do promotor central e de alguns elementos promotores proximais, com suas respectivas sequências consenso. Para ilustrar outros possíveis elementos regulatórios, na parte superior da figura foram incluídos um *enhancer* e um *insulator*. **Fonte:** adaptada de Geyer[8]

– são reconhecidas por proteínas que induzem a formação de *loops*, prevenindo a interação de um *enhancer* com um gene fora do *loop*.[8]

O elemento promotor central mais bem caracterizado é o *TATA box*, uma sequência de DNA rica em nucleotídeos A e T, localizado 25 nucleotídeos a montante do sítio de início da transcrição. O *TATA box* é reconhecido por um dos fatores de transcrição basal que, combinado com a RNA polimerase II e outros fatores de transcrição basais, formam o complexo de pré-iniciação da transcrição ou maquinaria de transcrição.[5]

Um gene pode ter mais de um promotor, o que resulta em transcritos com diferentes extensões da terminação 5'. Alguns genes possuem promotores fortes, ou seja, sequências consenso que se ligam de maneira mais eficiente à maquinaria de transcrição, enquanto outros possuem promotores fracos, cujas ligações são menos frequentes. A relevância funcional desses diferentes promotores é que permitem taxa de transcrição alta ou baixa, respectivamente.[5]

A 3'-UTR corresponde à região imediatamente a jusante do códon de terminação do gene, mas que também é transcrita no RNAm primário. A 3'-UTR é menos conservada que a 5'-UTR, ou seja, possui sequências diferentes entre os genes, mas também contém regiões regulatórias. Diferente da 5'-UTR, a regulação exercida pela 3'-UTR tem caráter predominantemente pós-transcricional, por meio de mecanismos que controlam a estabilidade e a eficiência de tradução do RNAm, especialmen-

te por conter sítios de ligação de proteínas regulatórias e de microRNA.[9]

Os genes de eucariotos são geralmente transcritos de maneira isolada; entretanto, regiões não codificantes, como alguns *clusters* de microRNA, compartilham um promotor comum. De forma contrária, a maioria dos genes de procariotos é organizada em *operons*, que são grupos de genes com funções relacionadas e que são transcritos como uma unidade.[10]

MAQUINARIA DE TRANSCRIÇÃO

Aspectos gerais

Como descrito anteriormente, o transcrito do DNA contém uma sequência codificadora, que será traduzida em determinada proteína, e sequências regulatórias que dirigem e regulam a síntese dessa proteína. Na medida em que o DNA é formado por duas fitas complementares e o RNAm por uma fita simples, apenas uma fita do DNA serve como molde para a transcrição. A outra fita terá sequência idêntica ao RNAm, exceto pela substituição da base nitrogenada timina (T) por uracila (U). A fita idêntica ao RNAm é denominada fita codificadora, enquanto a complementar é denominada fita molde. Em razão da propriedade da enzima RNA polimerase de adicionar nucleotídeos apenas à terminação 3' do RNAm nascente, durante a transcrição o DNA é lido no sentido 3' para 5', à medida que o transcrito é gerado no sentido 5' para 3'.[11]

A molécula de RNAm também difere do DNA pela presença de uma ribose no lugar da desoxirribose ligada a cada base nitrogenada. Apesar de apresentarem diferenças químicas sutis, DNA e RNA apresentam diferenças estruturais importantes. Enquanto o DNA ocorre na forma de hélice de fita dupla, o RNA é formado por uma fita simples, que pode se dobrar e adquirir uma estrutura tridimensional particular – semelhante ao que ocorre com uma cadeia polipeptídica durante a formação de uma proteína. Isso confere ao RNA a capacidade de adquirir funções estruturais e catalíticas precisas. O RNAm foi primeiramente identificado em 1961 pelos franceses François Jacob e Jacques Monod.[12]

A unidade ativa de transcrição de um gene é denominada *maquinaria de transcrição*. Essas unidades são observadas em regiões discretas agrupadas no núcleo, nas quais percebe-se a presença da enzima RNA polimerase na região promotora do gene. RNA polimerases são enzimas grandes compostas de muitas subunidades, que têm como função catalisar a produção do RNAm a partir de um gene ativo. Tipicamente, as RNA polimerases formam complexos com outros fatores que, em geral, sinalizam que o gene deve ser transcrito. Em eucariotos, existem três tipos de RNA polimerases: (1) RNA polimerase I, que transcreve os genes que codificam a maioria dos RNA ribossômicos (RNAr); (2) RNA polimerase III, que transcreve a subunidade menor do RNAr, os RNA transportadores (RNAt) e pequenas moléculas de RNA com função regulatória; (3) RNA polimerase II, que transcreve os RNAm e microRNA.

Etapas envolvidas na transcrição gênica

A expressão gênica de eucariotos é um processo bastante complexo, inicialmente porque, como já mencionado, existem três classes distintas de RNA polimerases que catalisam a transcrição. Além disso, muitos genes possuem sequências regulatórias distais – os *enhancers* – que controlam sua ativação por ligação com proteínas que alteram a estrutura tridimensional do DNA, permitindo que a RNA polimerase II seja atraída para a região promotora. Por fim, em razão do elevado grau de compactação do DNA de eucariotos, a transcrição necessita de um número considerável de proteínas especializadas, as quais auxiliam na acessibilidade da fita molde.[5]

A primeira etapa do processo básico de transcrição é a iniciação, quando a RNA polimerase II se liga em sequências especializadas a montante (5') da região codificadora do gene – a região promotora. Como a RNA polimerase II não pode iniciar a transcrição por si só, a iniciação começa com a formação de um complexo de proteínas, denominadas fatores de transcrição, no promotor central do gene que será transcrito. Essa etapa auxilia o posicionamento da RNA polimerase II na região de iniciação da transcrição. Além da RNA polimerase II, vários fatores de transcrição e componentes reguladores adicionais, como coativadores e complexos de remodelação da cromatina, formam o complexo de iniciação.[5]

A RNA polimerase II se move ao longo da cadeia molde de DNA em direção à extremidade 5' (sentido 3' → 5' do DNA). Nesse processo, a fita dupla de DNA é temporariamente desenrolada e a fita nascente de RNA cresce da sua extremidade 5' para a direção 3'. A RNA polimerase II catalisa a hidrólise de trifosfatos de ribonucleosídeos, formando monofosfatos de ribonucleosídeos que serão polimerizados na cadeia nascente, em um processo chamado elongação. Na temperatura de 37°C, a taxa estimada de adição de novos nucleotídeos é de 22 a 25 nucleotídeos por segundo. Durante a síntese, a RNA polimerase II se associa a uma série de proteínas que atuam como fatores de elongação, as quais impedem que a polimerase se dissocie precocemente do RNAm, antes que a transcrição esteja completa.[5]

As sequências de terminação são encontradas próximas às extremidades das sequências não codificadoras. Em eucariotos, a terminação da transcrição ocorre por diferentes processos, que dependem da polimerase envolvida. A transcrição catalisada pela RNA polimerase II pode continuar por centenas de nucleotídeos após a região codificadora, mas parte deles é removida por meio de dois mecanismos que ocorrem de forma coordenada com a terminação: a clivagem e a poliadenilação da extremidade 3'.[13]

Processamento do RNAm

Em eucariotos, a transcrição é apenas a primeira etapa necessária para produzir uma molécula de RNAm madura. Durante e após a fase de elongação, o RNAm primário é submetido a três tipos de processamento: (1) a adição de um nucleotídeo particular na sua terminação 5' (*capping*, traduzido como capeamento); (2) a excisão dos íntrons e união dos éxons adjacentes (*splicing**); e (3) a clivagem e poliadenilação da extremidade 3' do RNA.

Tão logo a RNA polimerase II inicia a síntese de RNA, a extremidade 5' do RNA nascente é modificada pelo capeamento, que consiste na adição de uma guanina modificada (GMP – metil guanosina). O capeamento depende da ação sequencial de três enzimas: (1) uma fosfatase, que remove o fosfato da extremidade 5'; (2) uma guanil transferase, que adiciona uma guanina; e (3) uma metil transferase, que adiciona um radical metil na guanina, formando o GMP. Ainda no núcleo, os RNAm que sofreram capeamento se ligam a um complexo proteico que facilitará o processamento e a exportação nuclear do RNAm maduro. Apenas os produtos da RNA polimerase II são capeados.[5]

A maior parte dos genes de eucariotos apresenta sequências interdispersas que não codificam proteínas. Essas sequências, denominadas íntrons, são transcritas junto com os éxons e precisam ser removidas para a formação do RNAm maduro que servirá como molde para síntese proteica. A remoção dos íntrons e a junção dos éxons é denominada *splicing*.[14]

A maquinaria que catalisa a remoção dos íntrons é complexa e inclui cinco moléculas adicionais de RNA nucleares pequenos (RNAsn) e centenas de proteínas que promovem a transesterificação coordenada dos nucleotídeos das junções entre dois éxons. O mecanismo requer o reconhecimento de sequências consenso pequenas e pouco conservadas. Estas se localizam não apenas nas extremidades 5' e 3', mas também na porção interna do íntron que será excisado. Em razão da variabilidade dessas sequências e do tamanho dos íntrons, seu reconhecimento tem sido um grande desafio científico.[5]

A unidade catalítica da maquinaria responsável pelo processamento é denominada *spliceosoma* e é composta pelos RNAsn e por várias ribonucleoproteínas nucleares pequenas (RNPsn). Assim, diferentemente do capeamento e da poliadenilação do RNA, as reações catalíticas envolvidas na remoção dos íntrons são mediadas por RNA. Os RNAsn reconhecem, por pareamento de bases, as três sequências consenso do RNA que será processado. Cada s*plincing*, por meio de duas reações sequenciais de transesterificação, promove a junção de dois éxons e a remoção de um íntron, formando a estrutura de um laço (*lariat*).[5]

Por fim, na terceira forma de processamento do RNA, sequências consenso da 3'-UTR transcrita são reconhecidas por proteínas específicas ligantes de RNA, em especial as proteínas denominadas CstF (*cleavage stimulation factor*) e CPFS (*cleavage and polyadenylation specific factor*). Uma vez ligadas ao RNAm nascente, ocorre uma sequência de eventos, alguns ainda pouco compreendidos. Resumidamente, o RNA é separado da polimerase e uma enzima, a poli-A polimerase, adiciona cerca de 200 nucleotídeos adenina na extremidade 3' produzida na clivagem. O nucleotídeo precursor da cauda poli-A é o ATP, e a síntese da cauda segue os mesmos princípios da síntese de RNA, exceto pela ausência de fita molde.[15]

Apenas as moléculas de RNAm corretamente processadas passam através dos poros nucleares para atingir o citoplasma, onde são traduzidas em proteínas.

Principais mecanismos envolvidos na regulação da expressão gênica

Conceitos básicos sobre expressão gênica

Transcrição e tradução são os processos pelos quais as células tornam ativas as instruções contidas em seus genes. A expressão dos genes de eucariotos é regulada primariamente no início da transcrição, processo que é controlado por proteínas que se ligam em sequências regulatórias específicas e que modulam a atividade da RNA polimerase. Em outras palavras, dois elementos com ação combinada compõem o mecanismo central da regulação da transcrição: sequências específicas do DNA, conhecidas como elementos em *cis*, ou seja, "do mesmo lado", e proteínas regulatórias – os elementos em *trans*. Os principais elementos de ação em *cis* são os promotores e os *enhancers*. Os elementos em *trans* são os fatores de transcrição, os coativadores e os correpressores.[5]

---

* Na língua portuguesa não existe um termo preciso para tradução desse fenômeno biológico.

Os genes transcritos pela RNA polimerase II apresentam dois promotores centrais em *cis*. O primeiro, denominado *TATA box* (sequência consenso TATTAA), se localiza cerca de 25 pb a montante do sítio de iniciação e constitui o único elemento promotor que tem localização relativamente fixa. O *TATA box* é o sítio de ligação de fatores de transcrição gerais, de histonas e da RNA polimerase II. O segundo é o elemento iniciador (INR), que atua como sítio de ligação específico para os diferentes fatores de transcrição.[16]

Durante a transcrição, a proteína TBP (proteína ligante de TATA) se liga ao *TATA box* e desenrola a dupla fita de DNA. A separação das fitas nessa região é favorecida pela sequência rica em AT, na medida em que as interações entre A e T são mais fracas que aquelas entre C e G. Fatores de transcrição da RNA polimerase II (TFII) também se ligam no *TATA box* e, em conjunto, são reconhecidos pela RNA polimerase II. Embora muitos genes humanos não possuam *TATA box* e utilizem o INR ou promotores a jusante, a ligação da TBP está sempre envolvida no início da transcrição. Assim, o INR é um promotor central com função similar ao *TATA box*, na medida em que é sítio de ligação de TBP e de TFII.[16]

Existem outros elementos regulatórios em *cis* localizados a montante do *TATA box*, que são regiões de ligação de diversos fatores de transcrição. Os *enhancers* aumentam a taxa de transcrição de um gene, compensando um promotor fraco. Em geral estão localizados a milhares de bases a montante do sítio de início da transcrição. Semelhante aos promotores, os *enhancers* se ligam a fatores de transcrição. Entretanto, uma diferença fundamental é que, em função de sua localização, a atividade transcricional dos *enhancers* depende do dobramento do DNA, de forma que este promova a interação entre fatores de transcrição ligados aos *enhancers* e à maquinaria transcricional.[5]

Fatores de transcrição, coativadores e correpressores

A partir dos conceitos expostos anteriormente, pode-se afirmar que fatores de transcrição são proteínas (elementos em *trans*) que se ligam tanto nos promotores quanto nos *enhancers* dos genes ativos.

Os fatores de transcrição gerais, ou seja, aqueles que se ligam aos promotores centrais *TATA box* e INR, são denominados TFII (*transcription factor II*). A ativação dos promotores gerais pelos TFII pode ser resumida na seguinte sequência:

1. TFIID se liga ao *TATA box*.
2. TFIIA se liga ao TFIID a montante.
3. TFIIB se liga ao TFIID a jusante.
4. RNA polimerase II se liga ao complexo de TFII previamente formado.
5. Outros TFII, como TFIIF, TFIIE e TFIIH, se associam e a transcrição é iniciada.
6. RNA polimerase II se desloca ao longo do gene, dissociada de TFIID e TFIIA.
7. TFIID e TFIIA permanecem ligados ao promotor central, onde poderão ancorar moléculas adicionais à RNA polimerase II.

O complexo proteico formado pela RNA polimerase II e os TFII é denominado complexo transcricional basal (BTC, *basal transcription complex*), o sistema mínimo necessário para a transcrição e, em geral, tem baixa atividade. A atividade adequada à resposta celular necessária é modulada pela ligação de fatores de transcrição adicionais nas outras regiões regulatórias, que estimulam o BTC.[13]

Assim, pode-se separar os fatores de transcrição em dois tipos:

- Fatores de transcrição gerais, que fazem parte da maquinaria básica ligada aos promotores ativados pela RNA polimerase II.
- Fatores de transcrição adicionais, que se ligam em sequências que podem ser específicas de um gene.

Estes últimos constituem o repertório de fatores de transcrição que regula a expressão gênica e determina o fenótipo celular em determinada condição fisiológica ou patológica. Em outras palavras, esses fatores de transcrição são elementos críticos que garantem que determinados genes sejam expressos na célula, no tempo e na quantidade corretos, dependendo das necessidades do organismo e de estímulos ambientais. Os principais fenômenos biológicos de eucariotos que dependem dos fatores transcricionais adicionais incluem:

- Desenvolvimento: a ativação ou inativação de genes em resposta a estímulos é fundamental na morfologia celular. As famílias dos principais fatores de transcrição reguladores do padrão de formação dos organismos multicelulares estão representadas na Tabela 2.1.
- Controle do ciclo celular: alguns fatores de transcrição, em especial os que são codificados por oncogenes ou por genes supressores de tumor, são reguladores do ciclo celular. Exemplos desses genes com funções importantes no crescimento celular são os oncogenes *MYC*, *MYB*, *FOS* e *JUN*.
- Comunicação celular: as células de um organismo se comunicam entre si por meio de moléculas liberadas que produzem ações específicas na célula-alvo. Uma clas-

se importante dessas moléculas é a dos hormônios esteroides, cujos receptores intracelulares se ligam em regiões do DNA e regulam a atividade transcricional de diversos genes. Os receptores de glicocorticoides (GR), de estrogênios (ER) e de progesterona (PR) são exemplos de receptores nucleares que atuam como fatores de transcrição ativados por estímulo hormonal.

- Resposta ao ambiente: além da ação direta dos hormônios, estímulos ambientais também têm como alvo fatores de transcrição. Por exemplo, o fator de choque térmico (HSF, *heat shock factor*) ativa a transcrição gênica em resposta a altas temperaturas, enquanto o fator induzido por hipóxia (HIF, *hypoxia inducible factor*) é ativado quando há redução da concentração de oxigênio.

Tabela 2.1 Exemplos de fatores de transcrição envolvidos no desenvolvimento celular

Família	Fator de transcrição	Algumas funções
HOX	Hoxa-1, Hoxb-2 etc.	Formação axial
POU	Pit-1, Unc-86, Oct-2	Desenvolvimento hipofisário e neural
LIM	Lim-1, Forkhead	Desenvolvimento cranial
Pax	Pax1, 2, 3 etc.	Especificação neural; desenvolvimento ocular
bHLH	MyoD, achaete	Especificação muscular e neural
bZip	C/EBP, AP1	Diferenciação hepática; especificação do tecido adiposo
Zinc finger	WT1, Krüppel	Desenvolvimento das gônadas, rins e macrófagos
Receptores hormonais nucleares	Receptor de glicocorticoide, receptor de estrógeno, receptor de testosterona, receptor de ácido retinoico	Determinação sexual secundária, desenvolvimento craniofacial e dos membros

Um terceiro nível de complexidade da regulação da transcrição gênica é dado por correguladores, que são proteínas que interagem com os fatores de transcrição. Essas proteínas – conhecidas como coativadores e correpressores – têm como função, respectivamente, aumentar ou reduzir a expressão de um gene. Entretanto, a característica de ambas é a de ligar-se aos fatores de transcrição, mas não diretamente no DNA. Em geral, os coativadores e correpressores competem pelo mesmo sítio de ligação nos fatores de transcrição. Alguns coativadores têm atividade enzimática de histona acetiltransferase, promovendo o relaxamento da cromatina e o aumento da acessibilidade ao DNA pela acetilação das histonas. Por sua vez, correpressores podem recrutar desacetilases, que removem o radical acetil das histonas, tornando a cromatina mais compacta e menos acessível à maquinaria de transcrição.[5]

Centenas de coativadores e correpressores já foram identificados, e grande parte destes se liga aos receptores nucleares (por exemplo, os receptores de glicocorticoides). As proteínas CBP (*CREB-binding protein*) e p300 são exemplos de coativadores que regulam a expressão gênica tanto pelo relaxamento da cromatina dependente da atividade intrínseca de histona acetiltransferase quanto pelo recrutamento da maquinaria de transcrição basal.[17]

Eucromatina e heterocromatina

A cromatina é um complexo formado primariamente por DNA, RNA e histonas, com capacidade de enovelamento e, por isso, permite que o DNA seja compactado de forma adequada ao volume celular. Entretanto, o grau de compactação do DNA não é homogêneo e duas formas com estrutura e função distintas podem ser observadas nos genomas de eucariotos: a eucromatina, que compreende as regiões menos compactadas da cromatina, e a heterocromatina, que compreende as regiões altamente compactadas. Nos procariotos, a única forma de cromatina presente é a eucromatina, o que indica que a formação da heterocromatina evoluiu com o aparecimento do núcleo celular, de forma a adaptar o tamanho do genoma de eucariotos ao volume nuclear.[18]

Essas duas formas foram originalmente identificadas em análises citológicas. A eucromatina tem coloração menos intensa, enquanto a heterocromatina tem coloração mais acentuada, indicando compactação do material genético. Entretanto, evidências indicam a presença de pelo menos quatro outros estados da cromatina, relacionados a diferentes combinações de marcadores epigenéticos.[19,20]

Por constituir as regiões menos compactadas do DNA, a eucromatina é a porção mais ativa do genoma. Sua estrutura desdobrada permite que os fatores de transcrição e a RNA polimerase se liguem ao DNA e iniciem a transcrição. Entretanto, nem toda eucromatina é necessariamente transcrita e as regiões dos genes que não necessitam ser expressos podem ser condensadas na forma de heterocromatina. Assim, há uma relação direta entre a proporção de eucromatina e o estado de atividade transcricional de uma célula. Diversos genes estão localizados em regiões nas quais a eucromatina aparece de forma constitutiva. Esses genes, sempre transcritos, são denominados genes constitutivos (*housekeeping genes*) e codificam proteínas necessárias às funções básicas da célula.[21]

A heterocromatina pode variar entre as formas constitutiva e facultativa. Ambas participam da regulação da

expressão gênica, porém por mecanismos distintos. A heterocromatina constitutiva tem função estrutural, é frequentemente encontrada em regiões como centrômeros e telômeros e sua característica estrutural está relacionada à inativação dos genes próximos a ela. Por sua vez, a formação da heterocromatina facultativa é resultado de outros eventos, como a desacetilação de histonas promovida pelos correpressores. Sob o ponto de vista funcional, a heterocromatina também mantém a integridade dos cromossomos. As fitas de DNA acessíveis podem ser interpretadas erroneamente, ser alvos de mecanismos de reparo do DNA e desencadear a parada do ciclo celular.[22]

A heterocromatina constitutiva é observada em todas as células de determinada espécie. Em humanos, todos os cromossomos Y, 1, 9 e 16 contêm extensas regiões de heterocromatina constitutiva. Já a heterocromatina facultativa não é encontrada em todos os tipos celulares de uma espécie; ademais, uma região de determinado cromossomo pode estar na forma de heterocromatina facultativa em um tipo celular e na forma de eucromatina em outro. Isso indica que essas regiões são reguladas e, frequentemente, estão associadas à morfogênese e à diferenciação celular.[23]

Certos estados de cromatina podem ser diretamente transmitidos de uma célula para suas descendentes. Como essa memória é baseada na estrutura, mas não na sequência do DNA, constitui-se em uma forma de herança epigenética. O prefixo *epi* significa "sobre", portanto, representa uma forma de herança que se sobrepõe à herança genética baseada na sequência do DNA. A heterocromatina é uma dessas formas; quando uma célula se divide, as células descendentes geralmente apresentam a heterocromatina nas mesmas regiões do DNA encontradas na célula-mãe.[23]

Metilação do DNA e modificação de histonas

Nos vertebrados, a metilação de citosinas é um mecanismo central de regulação epigenética. Metilação do DNA é o termo usado para a reação que liga covalentemente um radical metil às bases citosina do DNA, catalisada pelas DNA metil-transferases (DNMT). A metilação de citosinas a montante do gene inibe a expressão gênica. Em células somáticas, esta ocorre tipicamente em grupamentos de nucleotídeos CG, conhecidos como ilhas CpG (do inglês, *Cytosine-phosphate-Guanine*). Na medida em que as sequências das ilhas CG pareiam com sequências idênticas da fita complementar, ambas as fitas podem ser metiladas. Isso permite que o padrão de metilação de uma célula possa ser transmitido para as células-filhas durante a divisão celular.[5]

A metilação das citosinas não altera o pareamento e a replicação do DNA, que, ao final do processo, resulta em uma dupla hélice formada pela fita metilada (mãe) e uma fita não metilada (filha). Uma enzima denominada metil-transferase de manutenção reconhece a fita metilada e promove a metilação da fita replicada.[5]

A metilação do DNA auxilia na repressão da transcrição por diferentes mecanismos. Primeiro, os radicais metil dificultam a ligação de fatores de transcrição ao DNA. Segundo, as células possuem proteínas que se ligam especificamente ao DNA metilado, entre as quais as enzimas modificadoras de histonas.[5]

O genoma humano contém cerca de 20 mil ilhas CpG e cerca de 70% dos genes codificadores de proteínas apresentam essas ilhas nas regiões promotoras. Entretanto, existem mecanismos que mantêm as ilhas CpG não metiladas, os quais são mediados por proteínas que protegem as sequências CG da ação das DNA metil-transferases ou atraem DNA desmetilases.[24]

As alterações de expressão gênica por metilação do DNA costumam ser permanentes, o que previne uma célula diferenciada de retornar à forma de célula-tronco ou de se converter a um tipo celular diferente. Assim, a metilação do DNA é essencial para o desenvolvimento normal de um organismo, mas também está associada a processos fundamentais, como *imprinting* genômico, inativação do cromossomo X, supressão de elementos repetitivos e carcinogênese.[25]

Mencionou-se anteriormente que a subunidade fundamental da cromatina – o nucleossomo – é formada por uma sequência de cerca de 200 nucleotídeos organizados por um octâmero de histonas. Além de sua propriedade de permitir o empacotamento do DNA, essas proteínas têm função central na regulação da expressão gênica.

Histonas são proteínas alcalinas, altamente conservadas e localizadas no núcleo de eucariotos. Existem cinco grandes classes de histonas, H1/H5, H2A, H2B, H3 e H4, compostas de dezenas de proteínas. As histonas H1/H5 são proteínas de ligação, enquanto as classes H2A, H2B, H3 e H4 compõem o grupo das histonas essenciais, que possuem estrutura similar e participam do centro do nucleossomo. As histonas essenciais podem sofrer modificações covalentes que alteram suas interações com o DNA e com proteínas reguladoras da transcrição. As histonas H3 e H4 possuem longas terminações que se estendem para fora dos nucleossomos, o que favorece modificações covalentes em vários aminoácidos. Essas modificações incluem reações de fosforilação, me-

tilação, acetilação, ubiquinação, SUMOilação*, ADP-ribosilação e citrulinação.[26]

Cabe destacar que já foram descritas inúmeras modificações de histonas, mas as funções da maioria delas ainda são desconhecidas. Acredita-se que tais modificações compõem o "código das histonas", no qual a combinação de diferentes modificações em distintas histonas deve ter uma função específica. Detalhes mais específicos podem ser obtidos no Capítulo 5.

MicroRNA

Em 1986, cientistas de várias partes do mundo se reuniram para avaliar a possibilidade de uma colaboração científica internacional que tinha como objetivo a decodificação de toda a informação contida no genoma humano. Dessa proposta surgiu, alguns anos mais tarde, o Projeto Genoma Humano (PGH).

Na época, era amplamente aceito que os cerca de três bilhões de pares de bases do genoma formavam entre 50 e 150 mil genes codificadores de proteínas. Essa hipótese explicava os eventos complexos envolvidos no desenvolvimento embrionário humano e no funcionamento dos tecidos na vida pós-natal.

Com a conclusão do PGH em 2003, observou-se que os cerca de 25 mil genes identificados e mapeados[26] não explicavam a complexidade dos eventos biológicos. O restante do DNA não codificador, denominado na época *junk* DNA (DNA "lixo"), despertou interesse pela probabilidade de uma fração correspondente a mais de 98% do genoma poder servir a uma função particular. Os genes codificadores de proteínas são geralmente regulados por fatores de transcrição que atuam como reguladores a jusante do gene. Entretanto, a possibilidade de moléculas de RNA não codificadoras alterarem a expressão proteica parecia improvável na época. Um dos principais avanços para a elucidação dos mecanismos de regulação da informação genética surgiu da descoberta dos microRNA (miRNA).[28]

miRNA é a denominação de moléculas endógenas de RNA que, em sua fase madura, possuem entre 18 e 25 nucleotídeos e que atuam no processo de silenciamento da expressão gênica por meio da regulação negativa da taxa de tradução de RNAm específicos. O primeiro miRNA foi descoberto em 1993 por meio de rastreamento genético de mutações em *C. elegans*.[28] Desde então, milhares de miRNA já foram identificados ou caracterizados em diferentes espécies.

Regiões que transcrevem miRNA encontram-se distribuídas em todo o genoma em duas localizações básicas: em regiões intergênicas e dentro de regiões codificadoras de proteínas, principalmente compondo parte de íntrons. No primeiro caso, regiões que codificam miRNA possuem promotores que contribuem para a regulação de sua expressão. Grande parte desses miRNA encontra-se agrupada (*clusters*), ou seja, mais de um miRNA maduro é produzido a partir de um único transcrito primário, denominado RNA policistrônico. Além disso, a maior parte dos *clusters* contém mais de uma cópia de determinado miRNA, o que promove rápido aumento na síntese dessas moléculas em condições específicas, característica que permite a regulação efetiva dos genes alvos.[30]

Além dos miRNA policistrônicos, diversos miRNA são encontrados em regiões intrônicas de determinados genes. Quando os miRNA são produzidos a partir do processamento de um pré-RNAm, a coexpressão geralmente envolve o silenciamento de genes de ação antagônica à do gene hospedeiro, permitindo maior resposta fenotípica à sua expressão.[31] Além disso, há indícios de coevolução entre o gene hospedeiro e o miRNA intrônico.[32]

Independentemente da origem genômica, a biogênese de miRNA envolve uma série de processos comuns para todos esses transcritos. De forma geral, a primeira etapa de síntese de miRNA é a transcrição do gene específico pela atividade da RNA polimerase II ou, ocasionalmente, da RNA polimerase III, originando uma molécula intermediária com tamanho bastante superior ao miRNA maduro denominada miRNA primário (pri-miRNA). Os pri-miRNA estão sujeitos à complementariedade de bases em regiões específicas, o que resulta na formação de estruturas secundárias com característica física de grampos (*hairpins*). Posteriormente, os pri-miRNA são clivados por uma RNAse nuclear da classe III denominada *Drosha*, em processo que implica a liberação dos *hairpins* e a consequente formação dos miRNA precursores de cerca de 60 nucleotídeos (pré-miRNA).[30,33]

Os pré-miRNA são transportados para fora do núcleo pela ação de uma proteína de exportação, denominada exportina 5. Uma vez no citoplasma, esses transcritos são imediatamente processados pela RNAse III citoplasmática *Dicer*, que catalisa a retirada da alça que liga as fitas paralelas do duplex, promovendo a formação dos miRNA maduros que serão incorporados a um complexo proteico de silenciamento do RNAm (RISC, *RNA-inducing silencing complex*), composto de uma das fitas oriundas do duplex e por proteínas citoplasmáticas denominadas proteínas argonautas (AGO), TARBP (*the human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein*) e PACT (*interferon-inducible double stran-*

* SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) são pequenas proteínas similares às ubiquitinas. Quando ligadas covalentemente a outras proteínas, alteram suas funções.

ded RNA-dependent protein kinase activator A). A escolha da fita para composição do RISC dependerá da estabilidade termodinâmica das duas pontas do duplex. A fita que não é inicialmente utilizada pode ser descartada e degradada por nucleases citosólicas ou compor outro RISC. Quando isso acontece, identificam-se as diferentes fitas oriundas de um mesmo pré-miRNA com o sufixo -3p ou -5p, de acordo com a ponta livre.[34,35]

A regulação negativa da expressão exercida pelos miRNA é dependente da sua ligação a sequências complementares no RNAm alvo. Essa ligação permite a regulação pós-transcricional por indução da supressão/redução da síntese proteica e/ou degradação do RNAm alvo. Uma vez montado o complexo de silenciamento, a fita do miRNA atua como guia para a localização de sequências complementares nos RNAm alvos e o complexo é acoplado nessa molécula.[34,35]

Foram identificados mais de 2.500 miRNA humanos maduros, cujas sequências estão disponíveis em bancos de dados públicos (por exemplo, *miRBase Sequence Database*, www.mirbase.org). Acredita-se que cerca de 30% dos transcritos sejam regulados por miRNA; porém, a caracterização dos alvos funcionais tem sido uma tarefa desafiadora. Isso se deve ao fato de que cada miRNA pode potencialmente regular centenas de transcritos diferentes e o mesmo gene pode ser regulado por muitos miRNA. Potenciais genes alvos dos miRNA podem ser rastreados utilizando-se ferramentas computacionais, várias delas de domínio público.

Assim, dos milhares de miRNA identificados, apenas uma parcela teve seus alvos validados experimentalmente. Além dos resultados obtidos nas diversas áreas que já têm consistentemente estudado a participação dos miRNA nos processos biológicos – como a embriologia e a oncologia –, fortes evidências mostram que os miRNA têm importância central na regulação dos eventos moleculares envolvidos na patogênese da obesidade e do diabete melito.[36]

É importante destacar que, além dos miRNA, outros tipos de RNA não codificadores têm função regulatória. Alguns destes e suas respectivas funções estão listados na Tabela 2.2.

DEGENERAÇÃO DO CÓDIGO GENÉTICO E A TRADUÇÃO DE PROTEÍNAS

A informação genética do DNA que é transcrita pode ser traduzida em proteína graças à decodificação realizada pelos ribossomos, que polimerizam os aminoácidos na ordem especificada pelo RNAm e pelos RNAt, que carregam os aminoácidos e reconhecem três nucleotídeos do RNAm para cada aminoácido. Assim, o código genético define como essas trincas de nucleotídeos – denominadas códons – especificam o início, a sequência durante a elongação e o término da proteína nascente.

Entende-se por degeneração do código genético a redundância de códons em relação ao número de aminoácidos utilizados na síntese proteica, ou seja, há mais códons do que aminoácidos. Um códon pode diferir em qualquer um dos nucleotídeos da trinca, mas essa diferença frequentemente é encontrada no segundo ou terceiro nucleotídeo. Essa propriedade do código genético o torna mais tolerante a erros decorrentes de mutações por substituição de um único nucleotídeo. Assim, alguns erros causam mutações silenciosas que não alteram o ami-

Tabela 2.2 Principais tipos de RNA endógenos

Tipo	Descrição	Função
RNAm	RNA mensageiro	Codifica proteínas
RNAr	RNA ribossômico	Forma a estrutura básica dos ribossomos e catalisa a síntese de proteínas
RNAt	RNA transportador	Adaptador entre RNAm e aminoácidos durante a síntese proteica
snRNA	RNA nuclear pequeno	Participa do processamento do RNAm
snoRNA	RNA nucleolar pequeno	Participa do processamento do RNAr
miRNA	MicroRNA	Regula a expressão gênica por bloqueio da tradução com ou sem degradação do RNAm
siRNA	RNA de interferência pequeno	Regula negativamente a expressão gênica por direcionar a degradação seletiva do RNAm e por estabelecer a estrutura compacta da cromatina
piRNA	RNA de interação com Piwi	Protege as células germinativas de elementos de transposição por ligação às proteínas Piwi
lcnRNA	RNA não codificador longo	Serve como plataforma para montagem de complexos; regula a inativação do cromossomo X

Figura 2.4 Degeneração ou ambiguidade do código genético: alguns aminoácidos podem ser codificados por mais de um códon. UAA, UAG e UGA são códons de término da tradução. Phe (F): fenilalanina; Leu (L): leucina; Ile (I): isoleucina; Met (M): metionina (códon de início da tradução); Val (V): valina; Ser (S): serina; Pro (P): prolina; Thr (T): treonina; Ala (A): alanina; Tyr (Y): tirosina; His (H): histidina; Gln (Q): glicina; Asn (N): asparagina; Lys (K): lisina; Asp (D): aspartato; Glu (E): ácido glutâmico; Cys (C): cisteína; Trp (W): triptofano; Arg (R): arginina; Gly (G): glicina. **Fonte:** Alberts.[5]

noácido traduzido e, portanto, não interferem na tradução da proteína.[5]

A Figura 2.4 lista os 20 aminoácidos e seus respectivos códons. Cada aminoácido é representado por três letras ou por uma letra. Para a maioria dos códigos de três letras utilizam-se as três primeiras do aminoácido (em inglês), com a primeira letra em maiúsculo. As exceções são isoleucina (Ile), triptofano (Trp), asparagina (Asn) e glutamina (Gln). Os códigos de uma letra não são tão óbvios, mas existem algumas regras que facilitam sua memorização:

- Se apenas um aminoácido se inicia com uma determinada letra, esta é usada: C = cisteína; H = histidina; I = isoleucina; M = metionina; S = serina; V = valina.
- Se mais de um aminoácido se inicia com determinada letra, a letra é utilizada para o aminoácido de ocorrência mais frequente: A = alanina; G = glicina; L = leucina; P = prolina; T = treonina.
- Para os demais aminoácidos utilizam-se letras foneticamente sugestivas (em inglês) ou próximas à inicial no alfabeto: F = fenilalanina ("*Phenylalanine*"); R = arginina ("*aRginine*"); Y = tirosina ("*tYrosine*"); Q = glutamina ("*Q-tamine*"); D = ácido aspártico (próximo do A); E = ácido glutâmico (próximo ao G); K = lisina (próximo ao L); N = asparagina (contém N); W = triptofano (em referência ao anel duplo da molécula).

Durante a tradução, o RNAm é lido de acordo com o código genético, relacionando a sequência do DNA à sequência de aminoácidos na proteína. Cada grupo de três bases do RNAm constitui um códon e cada códon especifica um aminoácido particular. A sequência de RNAm é, portanto, usada como molde para a ordem e a montagem da cadeia de aminoácidos que formam uma proteína.[4]

Em todas as células, a maquinaria de tradução reside em organelas especializadas denominadas ribossomos. Nos eucariotos, os RNAm maduros devem deixar o núcleo e dirigir-se aos ribossomos. Nos procariotos, os ri-

bossomos podem se ligar aos RNAm enquanto estes ainda estão sendo transcritos.

Os ribossomos são compostos de duas subunidades: uma maior (50S) e uma menor (30S)*. Cada subunidade existe separadamente no citoplasma e estas se ligam em conjunto na molécula de RNAm. As subunidades contêm proteínas e moléculas especializadas de RNA, os RNA ribossômicos (RNAr) e os RNA transportadores (RNAt). Os RNAt são moléculas adaptadoras que possuem uma extremidade (anticódon) que reconhece os códons do RNAm por meio de pareamento complementar das bases e outra extremidade que se liga a um aminoácido específico (Figura 2.5). A ligação do aminoácido ao seu RNAt correspondente é catalisada pela enzima aminoacil RNAt sintetase, por meio de uma ligação éster que utiliza a energia do ATP. Os produtos dessa reação são moléculas de aminoacil-RNAt. A ideia de que o RNAt é uma molécula adaptadora foi proposta por Francis Crick.[5]

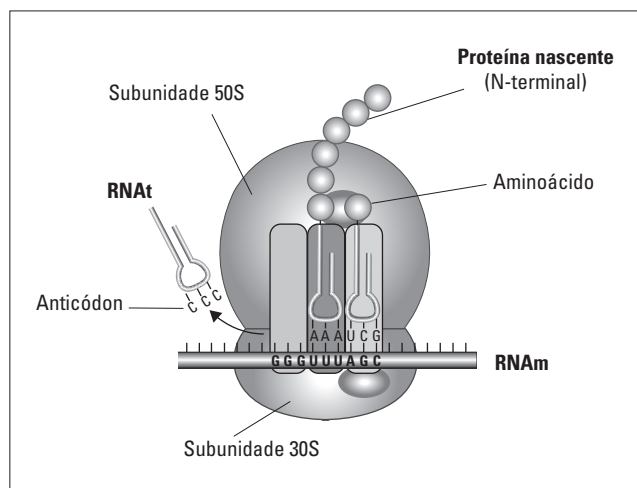



Figura 2.5 Estrutura de um ribossomo. **Fonte:** Alberts.[5]

Assim, a ligação entre RNAm e aminoacil-RNAt facilita o pareamento das bases nos ribossomos, e o RNAr catalisa a ligação de cada aminoácido à cadeia nascente da proteína. A tradução é iniciada com a formação de um complexo no RNAm. Inicialmente, três fatores de iniciação (IF1, IF2 e IF3) se ligam à subunidade 30S do ribossomo. Em seguida, esse pré-complexo e um aminoacil-RNAt carreador de metionina se ligam ao RNAm próximo ao códon de iniciação AUG, formando o complexo de iniciação.[13]

Como mencionado anteriormente, não é a molécula inteira de RNAm que possui trincas correspondentes a um determinado aminoácido; sequências específicas a montante (5') e a jusante (3'), denominadas regiões não traduzidas (UTR), não possuem função codificadora. Em particular, uma porção 5'-UTR do RNAm localiza-se entre o códon de iniciação (AUG) e o primeiro nucleotídeo da sequência traduzida. A importância dessa porção 5'-UTR reside na presença de sítios ligantes de ribossomos, conhecidos nos vertebrados como sequência consenso de *Kozak*. Em humanos, o tamanho médio dessa região é de 170 nucleotídeos e pode conter sequências regulatórias, como sítios de ligação de proteínas.[13]

Embora a metionina seja o primeiro aminoácido incorporado em toda a cadeia nascente, este não é o primeiro de muitas proteínas maduras, visto que a metionina pode ser removida após a tradução. Ademais, nem todo aminoácido pode ser o segundo da cadeia e isso influencia a remoção ou não da metionina. Por exemplo, muitas proteínas têm como segundo aminoácido a alanina. Nesse caso, a metionina é removida e a alanina passa a ser o aminoácido N-terminal da proteína. Se o segundo aminoácido for uma lisina, a metionina não é removida.[13]

Uma vez que o complexo de iniciação é formado, a subunidade ribossômica maior se liga ao complexo e libera os IF. Essa subunidade possui três sítios de ligação para moléculas de aminoacil-RNAt. O sítio A (de aminoacil) é o local onde o anticódon do RNAt pareia com o códon do RNAm, garantindo assim que o aminoácido correto seja adicionado à cadeia nascente. Esse sítio funciona como o aceptor de aminoácidos durante a formação das ligações peptídicas. O sítio P (de peptidil) é onde o aminoácido é transferido de seu RNAt para a cadeia nascente; como esse sítio é ocupado por peptidil-RNAt, é o que carrega a cadeia peptídica nascente. O sítio E (do inglês *exit*) é onde o RNAt vazio se acopla antes de ser liberado do ribossomo e de se ligar a uma nova molécula do aminoácido correspondente no citoplasma.[5]

O RNAt de iniciação, carreador da metionina, é o único aminoacil-RNAt que pode se ligar ao sítio P do ribossomo**. Quando ele se liga ao ribossomo, o sítio A se alinha ao segundo códon do RNAm, permitindo a ocupação deste pelo segundo aminoacil-RNAt e a imediata ligação peptídica entre a metionina e o segundo aminoácido. A formação da ligação peptídica é catalisada pelo próprio ribossomo e caracteriza a fase de elongação; com a ligação do complexo aminoácido-RNAt ao sítio A, o GTP é clivado e os fatores de elongação são liberados e reutilizados em um novo ciclo de elongação.[5]

No RNAm, a sequência dos sítios é E-P-A, orientados no sentido 5'-3', que é a direção de movimento dos ribossomos (Figura 2.6). Durante o movimento do ribossomo para o códon seguinte do RNAm, o RNAt vazio é deslo-

---

* S é a sigla da unidade *svedberg*, uma medida de velocidade de sedimentação que, portanto, representa a massa.

** O sítio P reconhece preferencialmente as moléculas de peptidil-RNAt.

cado do sítio P para o sítio E, e o peptidil-RNAt, do sítio A para o sítio P. Esse processo, facilitado por fatores de elongação e pela hidrólise de GTP, é denominado translocação. Após a translocação, o peptidil-RNAt é posicionado no sítio P e o próximo códon do RNAm fica disponível para a interação com um novo aminoacil-RNAt no sítio A.[11]

Essas reações são repetidas até que o ribossomo encontra um códon de terminação na sequência do RNAm. Existem três códons de terminação – UAA, UAG e UGA – que, por não serem reconhecidos pelos RNAt, se ligam a proteínas denominadas fatores de liberação, que facilitam a dissociação do RNAm do ribossomo.[11]

O processo de tradução de procariotos e eucariotos é muito semelhante. Embora sejam utilizados diferentes fatores de iniciação, elongação e terminação, o código genético é idêntico. Mencionou-se anteriormente que, em bactérias, a transcrição e a tradução ocorrem simultaneamente e, por isso, os RNAm têm meia-vida relativamente curta. Nos eucariotos, os RNAm têm meia-vida altamente variável, estão sujeitos a modificações e precisam ser transportados do núcleo para o citoplasma antes de serem traduzidos. Essas múltiplas etapas acrescentam níveis adicionais de regulação da produção de proteínas e representam ajuste fino e preciso da expressão gênica.[11]

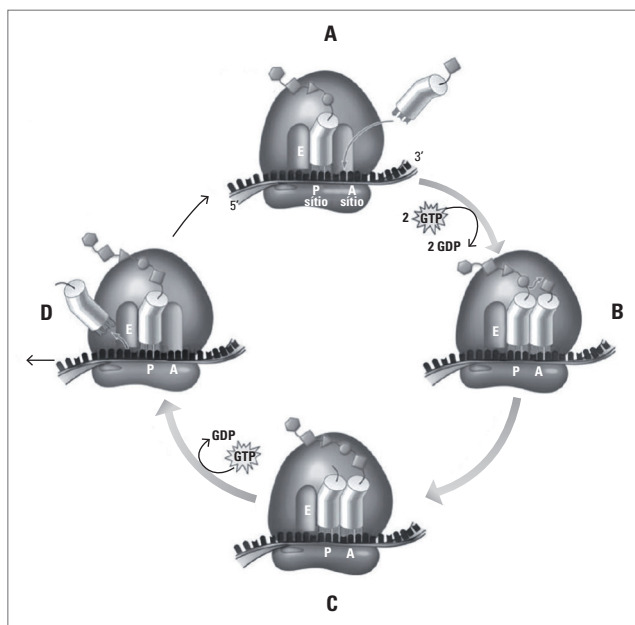



Figura 2.6 Processo de tradução no ribossomo. A: o anticódon de um RNAt que chega ao ribossomo pareia as bases com o códon complementar no sítio A; B: uma ligação peptídica é formada entre o novo aminoácido no sítio A e o polipeptídeo que está sendo formado no sítio P; C: o ribossomo transloca o RNAt no sítio A para o sítio P; D: o RNAt vazio no sítio P é transferido para o sítio E e liberado. O RNAm se move para o próximo códon no sítio A. **Fonte:** Alberts.[11]

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Expressão gênica é, por definição, o processo pelo qual a informação de um gene é utilizada para a síntese de um produto funcional. Como molécula central, o RNAm aparece como o intermediário móvel entre o gene e seu peptídeo. Entretanto, quanto mais os cientistas estudam as moléculas de RNA, mais propriedades são descobertas. Por exemplo, sabe-se atualmente que proteínas diferentes podem ser produzidas a partir de um único gene por *splicing* alternativo. Pesquisadores também demonstraram que, além da transcrição, a estabilidade do RNAm – que representa seu potencial para tradução – é um mecanismo fisiológico rápido de regulação da expressão gênica. Por fim, a relevância funcional dos ncRNAs como reguladores da expressão gênica parece ser a principal descoberta da era pós-genoma a ser explorada.

REFERÊNCIAS

1. Dahm R. Friedrich Miescher and the discovery of DNA. Dev Biol. 2005;278(2):274-88.
2. Crick FHC. On protein synthesis. Symp. Soc. Exp. Biol. 1956;XII:139-63.
3. Strasser BJ. A world in one dimension: Linus Pauling, Francis Crick and the central dogma of molecular biology. Hist Philos Life Sci. 2006;28(4):491-512.
4. Crick F. Central dogma of molecular biology. Nature. 1970; 227 (5258):561-63.
5. Alberts B, Jonhson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 6.ed. New York: Garland Science; 2015.
6. Winter SL, Wong P, Alexandrow MG. In vivo chromatin decondensation assays: molecular genetic analysis of chromatin unfolding characteristics of selected proteins. Methods Mol Biol. 2009;523:27-40.
7. Perdomo-Sabogal A, Kanton S, Walter MB, Nowick K. The role of gene regulatory factors in the evolutionary history of humans. Curr Opin Genet Dev. 2014;29:60-67.
8. Geyer PK. The role of insulator elements in defining domains of gene expression. Curr Opin Genet Dev. 1997;7(2):242-48.
9. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA: microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. Dev Biol. 2007;302(1):1-12.
10. Blumenthal T. Operons in eukaryotes. Brief Funct Genomic Proteomic. 2004;3(3):199-211.
11. Alberts B, Lewis J, Raff M, Walter P, Bray D, Hopkin K, Johns AD. Essential cell biology. 4.ed. New York: Garland Science; 2014.
12. Rajewsky N. MicroRNAs and the Operon paper. J Mol Biol. 2011;409(1):70-75.
13. Clark DP, Pazdernik NJ. Molecular biology. 2.ed. Waltham: Elsevier Academic Press/Cell Press; 2013.
14. Humphrey T, Christofori G, Lucijanic V, Keller W. Cleavage and polyadenylation of messenger RNA precursors in vitro occurs within large and specific 3' processing complexes. Embo J. 1987;6(13):4159-68.
15. Wahle E, Rüegsegger U. 3'-End processing of pre-mRNA in eukaryotes. Fems Microbiol Rev. 1999;23(3):277-95.

16. Venters BJ, Pugh BF. Genomic organization of human transcription initiation complexes. Nature. 2013;502(7469):53-58.
17. Wang L, Tang Y, Cole PA, Marmorstein R. Structure and chemistry of the p300/CBP and Rtt109 histone acetyltransferases: implications for histone acetyltransferase evolution and function. Curr Opin Struct Biol. 2008;18(6):741-47.
18. Babu A, Verma RS. Chromosome structure: euchromatin and heterochromatin. Int Rev Cytol. 1987;108:1-60.
19. Margueron R, Reinberg D. Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information. Nat Rev Genet. 2010;11(4):285-96.
20. van Steensel B. Chromatin: constructing the big picture. Embo J. 2011;30(10):1885-95.
21. Ernst J, Kheradpour P, Mikkelsen TS, Shoresh N, Ward LD, Epstein CB et al. Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types. Nature. 2011;473(7345):43-49.
22. Wang J, Lawry ST, Cohen AL, Jia S. Chromosome boundary elements and regulation of heterochromatin spreading. Cell Mol Life Sci. 2014;71(24):4841-52.
23. Probst AV, Almouzni G. Pericentric heterochromatin: dynamic organization during early development in mammals. Differentiation. 2008;76(1):15-23.
24. Saxonov S, Berg P, Brutlag DL. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103(5):1412-17.
25. Massah S, Beischlag TV, Prefontaine GG. Epigenetic events regulating monoallelic gene expression. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2015;50(4):337-58.
26. Rossetto D, Avvakumov N, Côté J. Histone phosphorylation: a chromatin modification involved in diverse nuclear events. Epigenetics. 2012;7(10):1098-108.
27. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. Nature. 2004;431(7011):931-45.
28. Ambros V. The functions of animal microRNAs. Nature. 2004;431(7006):350-55.
29. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell. 1993;75(5):843-54.
30. Graves P, Zeng Y. Biogenesis of mammalian microRNAs: a global view. Genomics Proteomics Bioinformatics. 2012;10(5):239-45.
31. Barik S. An intronic microRNA silences genes that are functionally antagonistic to its host gene. Nucleic. Acids. Res. 2008;36(16):5232-41.
32. He C, Li Z, Chen P, Huang H, Hurst LD, Chen J. Young intragenic miRNAs are less coexpressed with host genes than old ones: implications of miRNA-host gene coevolution. Nucleic Acids Res. 2012;40(9):4002-12.
33. Cullen BR. Transcription and processing of human microRNA precursors. Mol. Cell. 2004;16(6):861-65.
34. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. Cell. 2003;115(2):209-16.
35. Shwarz DS, Hutva'Gner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. Cell. 2003;115(2):199-208.
36. Fernandez-Valverde SL, Taft RJ, Mattick JS. MicroRNAs in -cell biology, insulin resistance, diabetes and its complications. Diabetes. 2011;60(7):1825-31.

Parte 2
Fundamentos da genômica nutricional

Fundamentos da nutrigenômica | 3

Cristiane Cominetti
Marcelo Macedo Rogero
Maria Aderuza Horst

INTRODUÇÃO

Durante o século XX, a ciência da nutrição teve como foco a descoberta de vitaminas e minerais essenciais para o ser humano, bem como a busca pela prevenção de doenças ocasionadas pela deficiência desses micronutrientes. Mais recentemente, os estudos na área da nutrição e da medicina moderna passaram a ampliar os campos de investigação relacionados aos aspectos fisiológicos e moleculares de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como obesidade, câncer, diabete tipo 2, doença cardiovascular, entre outras.[1,2] Para reduzir o risco dessas doenças, os estudos na área da nutrição passaram a investigar como otimizar e manter a homeostase em nível celular, tecidual e corporal. Para tanto, é necessário o conhecimento de como os nutrientes atuam em nível molecular, o que envolve a interação destes com genes e proteínas.

Desse modo, a pesquisa no campo da nutrição passou também a englobar, além de epidemiologia e fisiologia, aspectos de biologia molecular e de genética. Nesse contexto, surgiram os estudos de nutrigenômica, que têm por objetivo investigar os efeitos dos nutrientes e dos compostos bioativos dos alimentos (CBA) sobre a expressão de genes e suas consequências nas relações entre saúde e doenças.[3] Os estudos de nutrigenômica ampliam o conhecimento de como a alimentação exerce influência em diferentes vias metabólicas e no controle da homeostase e como ela pode ser utilizada na redução do risco do desenvolvimento das DCNT.[4]

De acordo com Kaput e Rodriguez,[5] os conceitos básicos da nutrigenômica podem ser resumidos em:

- Nutrientes e CBA atuam sobre o genoma humano, direta ou indiretamente, alterando a expressão ou a estrutura de genes.
- Em determinadas circunstâncias e em alguns indivíduos, a alimentação pode ser fator de risco relevante para o desenvolvimento de determinadas doenças.
- Alguns genes regulados pela alimentação atuam no início, na incidência e na progressão e/ou gravidade de DCNT.
- O grau com o qual a alimentação influencia o equilíbrio entre saúde e doença pode depender da constituição genética do indivíduo.
- Intervenções alimentares baseadas no conhecimento das necessidades de nutrientes, do estado nutricional individual e do genótipo podem ser utilizadas para otimizar a saúde e prevenir ou curar DCNT.

Portanto, o objetivo deste capítulo é descrever os conceitos básicos e apresentar alguns exemplos de estudos de nutrigenômica, de forma a auxiliar o leitor na compreensão de capítulos mais específicos que compõem o livro.

MECANISMOS DE ATUAÇÃO DE NUTRIENTES E CBA NA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

Mecanismos direto e indireto

Nutrientes e CBA podem modular a expressão gênica de forma direta ou indireta. A primeira refere-se à situação em que a substância interage diretamente com elementos regulatórios, basicamente como ligante de receptores nucleares ou de fatores de transcrição, o que promove alterações na taxa de transcrição de gene(s) alvo. Exemplos de nutrientes que podem atuar dessa

maneira incluem ácido retinoico, calcitriol, ácidos graxos de cadeia curta e longa, esteróis e zinco.[6]

Para exemplificar o mecanismo direto de controle da expressão gênica por nutrientes, serão abordados, resumidamente, os aspectos das vitaminas A e D. Com relação à vitamina A, em alimentos de origem animal, ela aparece como palmitato de retinila, o qual é metabolizado no intestino em retinol. Este é precursor do ácido retinoico 9-cis e do ácido retinoico todo trans, os quais conseguem se deslocar diretamente para o núcleo celular e se ligar em receptores nucleares – o ácido retinoico 9-cis se liga ao receptor x de retinoides (RXR) e o ácido retinoico todo trans, ao receptor de ácido retinoico (RAR), em uma sequência específica de nucleotídeos na região promotora do gene, conhecida como elemento de resposta ao ácido retinoico (Rare, *retinoic acid response element*). Após a ativação completa de toda a maquinaria de transcrição, incluindo a atividade da RNA polimerase 2, a ligação dessas formas ativas da vitamina A aos receptores nucleares estimula a expressão de genes, como o da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), envolvida, por exemplo, na gliconeogênese (Figura 3.1).[7]

Outro exemplo de nutriente que regula a expressão gênica de forma direta refere-se à vitamina D. O calcitriol, forma ativa da vitamina, transloca diretamente para o núcleo, onde se liga a seu receptor, o VDR (*vitamin D receptor*). Esse complexo se liga em uma região do DNA conhecida como elemento de resposta à vitamina D (VDRE, *vitamin D response element*), forma um heterodímero com o RXR e, após a ligação de outros fatores de transcrição auxiliares e da RNA polimerase 2, ativa a transcrição de diversos genes. Um exemplo relaciona-se ao controle da expressão do gene supressor de tumor p53 em mastócitos e colonócitos.[8]

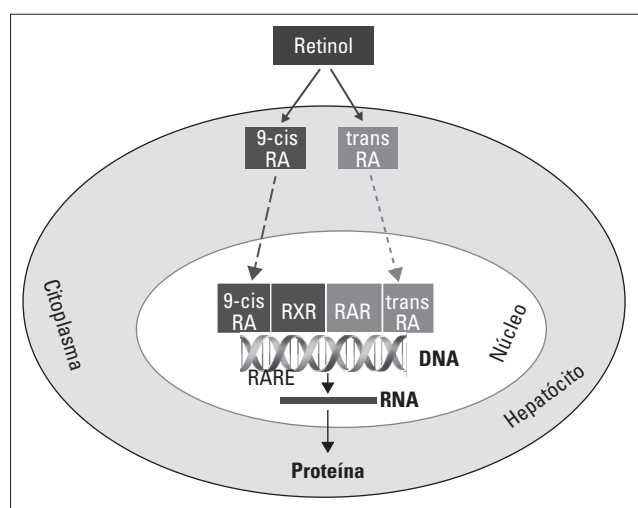



Figura 3.1 Mecanismo direto de regulação da expressão gênica pelo ácido retinoico. RA: ácido retinoico; RAR: receptor de ácido retinoico; RXR: receptor x de retinoides. **Fonte:** adaptada de McGrane.[7]

No mecanismo indireto de controle de expressão gênica, o nutriente ou CBA não se desloca diretamente para o núcleo, mas ativa uma cascata de sinalização que resultará na translocação de determinado fator de transcrição do citoplasma para o núcleo celular e, consequentemente, na regulação da expressão gênica. CBA como o resveratrol e a ginesteína podem influenciar as vias de sinalização celular, com ações pós-transcricionais, a modulação da estabilidade do RNAm ou, ainda, sua tradução em proteínas nos ribossomos por meio do bloqueio da fosforilação do inibidor de kappa B (IkB).[9]

O fator nuclear kappa B (NF-kB) é um fator de transcrição que se liga à região promotora de genes, nos sítios kB, e promove a expressão de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento, moléculas de adesão celular, imunorreceptores ou proteínas de fase aguda. No citoplasma das células, ele aparece ligado a proteínas inibitórias denominas IkB. Um dos processos que pode ativar esse complexo NF-kB–IkB é a fosforilação do IkB, que promove a translocação do NF-kB para o núcleo celular, onde este fator de transcrição se liga aos sítios kB na região promotora e, assim, promove a expressão de genes.[10] Em células endoteliais, sob o estímulo de citocinas ou de radicais livres, o NF-kB pode ser ativado. Pode haver, por exemplo, aumento da expressão do gene que codifica a molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1), que medeia a adesão de leucócitos ao endotélio, processo intimamente relacionado à aterosclerose.[11] Um exemplo de CBA que pode bloquear ou atenuar essa via é o resveratrol, um composto fenólico presente em uvas, suco de uva e vinho tinto, que tem a capacidade de bloquear a fosforilação do IkB, impedindo, por consequência, o deslocamento do NF-kB para o núcleo e a consequente expressão de genes relacionados ao processo pró-inflamatório (Figura 3.2).[12] Além disso, já se sabe que outros CBA também têm a capacidade de regular indiretamente a atividade do NF-kB, como a capsaicina da pimenta, a genisteína da soja, as catequinas do chá-verde, o gingerol do gengibre e a curcumina do açafrão-da-terra.[13]

Além disso, nutrientes e CBA podem ser metabolizados por diferentes vias, o que resulta na modificação da concentração de substratos e intermediários que também podem afetar a expressão gênica. Alternativamente, os substratos ou intermediários podem modular vias de sinalização celular também envolvidas na expressão gênica. Os efeitos dessas interações entre genes e nutrientes ou CBA podem ser deletérios ou benéficos ao organismo, resultando, por exemplo, no aumento do risco ou na proteção contra o desenvolvimento de determinadas DCNT (Figura 3.3).[14]

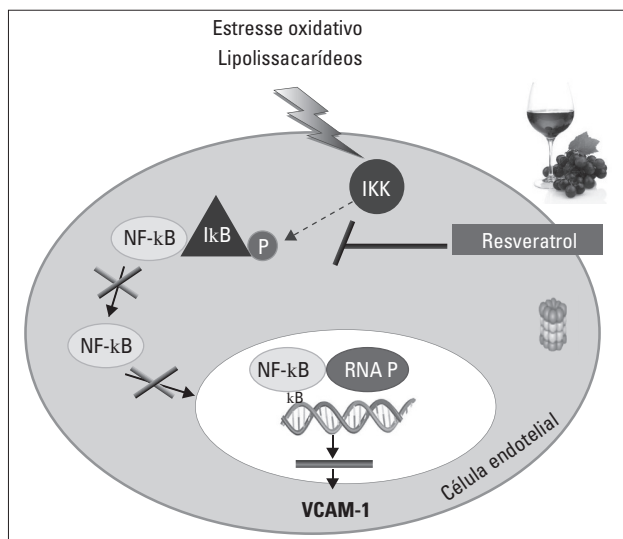



Figura 3.2 Mecanismo indireto de controle da expressão gênica por compostos bioativos de alimentos. O resveratrol tem a capacidade de interferir na ação da quinase do inibidor de kappa B (IKK), o que, por consequência, irá impedir ou reduzir a translocação do NF-kB para o núcleo e a subsequente transcrição de genes pró-inflamatórios, como o da molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1). **Fonte:** adaptada de Csiszar et al.[12]

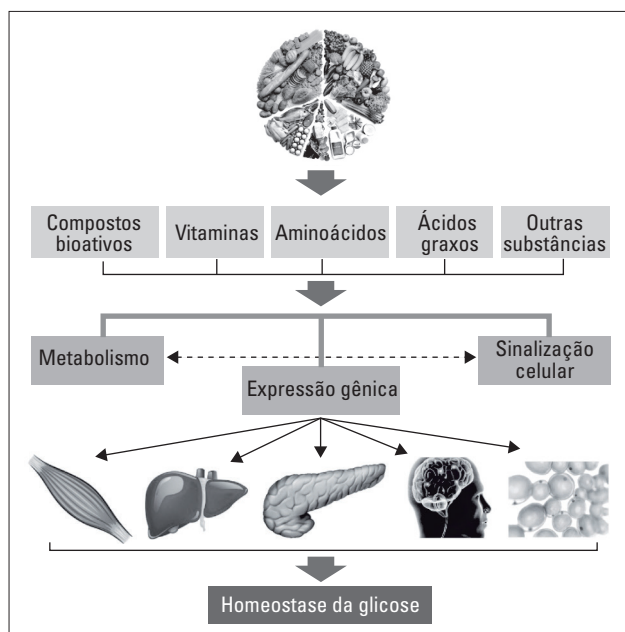



Figura 3.3 Interações entre nutrientes, compostos bioativos e expressão gênica na regulação do metabolismo da glicose. F: região C-terminal. **Fonte:** adaptada de Berná et al.[14]

NUTRIENTES, CBA E RECEPTORES NUCLEARES

Receptores nucleares são uma classe de proteínas intracelulares responsáveis pela detecção de hormônios e outras moléculas e, por apresentarem a capacidade de se ligar diretamente em locais específicos do DNA e de regular a expressão de genes, são classificados como fatores de transcrição. Para que a regulação da expressão gênica ocorra, é necessária a ligação de uma molécula que modifica o comportamento do receptor – o ligando ou ligante. Isso altera a conformação do receptor, de forma que ele se torna ativo e exerce ação de regulação positiva ou negativa da expressão de genes.[15]

Conforme pode ser observado no Quadro 3.1, a superfamília dos receptores nucleares contém 48 diferentes tipos de receptores, envolvidos na regulação de diversos processos no organismo, como reprodução, desenvolvimento embrionário, metabolismo, inflamação, apoptose, entre outros. Alguns receptores nucleares apresentam hormônios ligantes específicos, como o hormônio tireoidiano, o estradiol, a progesterona, a testosterona, o cortisol e a aldosterona, ou mesmo as formas biologicamente ativas das vitaminas A e D. Em contraste, outros receptores nucleares podem ter como ligantes alguns lipídios provenientes da alimentação, como ácidos graxos e oxisteróis. Além disso, existem receptores nucleares, conhecidos como órfãos, que não têm nenhum tipo de ligante natural identificado até o momento.[16-18]

Os receptores nucleares são formados por três domínios principais (Figura 3.4). A região aminoterminal (também conhecida como domínio A/B) contém a função 1 de ativação independente do ligante (AF-1), que é responsável, por exemplo, pela fosforilação de outros receptores nucleares, como os ativados por proliferadores de peroxissomos (PPAR). Outra região conhecida é o domínio de ligação central do ácido desoxirribonucleico (DBD) ou domínio C, que promove a ligação do fator de transcrição ao elemento de resposta na região promotora do gene alvo. A região LBD (domínio terminal de ligação ao ligante) é responsável pela especificidade do ligante e pela ativação da ligação do fator de transcrição ao elemento de resposta, o que promove o aumento da expressão do gene alvo.[19]

O PPAR é um receptor nuclear que funciona como um fator de transcrição e apresenta três isotipos identifi-

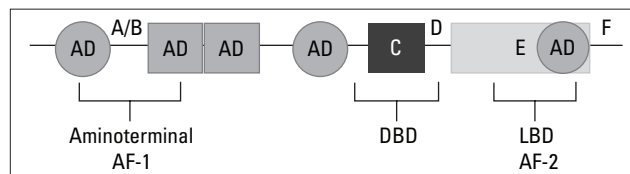



Figura 3.4 Estrutura dos receptores nucleares. AD: domínio de ativação; A/B: região aminoterminal; AF-1: domínio de transativação-1; AF-2: ativação induzida pelo ligante; C: local onde se encontra o DBD (domínio de ligação central); D: região de dobradiça, que liga o DBD ao LBD (domínio terminal de ligação ao ligante); E: local onde se encontra o LBD; F: região C-terminal. **Fonte:** Alberts et al.[19]

Quadro 3.1 Receptores nucleares e seus respectivos ligantes

Nome	Abreviação	Ligante
Receptor do hormônio da tireoide	TR-alfa	Hormônio da tireoide
	TR-beta	Hormônio da tireoide
Receptor do ácido retinoico	RAR-alfa	Ácido retinoico
	RAR-beta	Ácido retinoico
	RAR-gama	Ácido retinoico
Receptor ativado por proliferadores de peroxissomos	PPAR-alfa	Ácidos graxos, leucotrieno B4, fibratos
	PPAR-beta	Ácidos graxos
	PPAR-gama	Ácidos graxos e prostaglandinas J2
ErbA reverso	Rev-erb-alfa	Órfão
	Rev-erb-beta	Órfão
Receptor órfão relacionado ao ácido retinoico	ROR-alfa	Colesterol e colesteril sulfato
	ROR-beta	Ácido retinoico
	ROR-gama	Ácido retinoico
Receptor X hepático	LXR-alfa	Oxisteróis, T0901317, GW3965
	LXR-beta	Oxisteróis, T0901317, GW3965
Receptor X de farnesoide	FXR-alfa	Ácidos biliares e fexaramina
	FXR-beta	Lanosterol
Receptor de vitamina D	VDR	Calcitriol e ácido litocólico
Receptor X de pregnano	PXR	Xenobiótico e pregnenolona 16-alfa carbonitrila
Receptor androstano constitutivo	CAR	Xenobióticos e fenobarbital
Fator nuclear humano 4	HNF4-alfa	Órfão
	HNF4-gama	Órfão
Receptor X de retinoide	RXR-alfa	Ácido retinoico
	RXR-beta	Ácido retinoico
	RXR-gama	Ácido retinoico
Receptor do testículo	TR-2	Órfão
	TR-4	Órfão
Tailless	TLL	Órfão
Receptor nuclear fotorreceptor específico	PNR	Órfão
Fator I de transcrição de promotor *upstream* de ovalbumina de galinha	COUP-TFI	Órfão
	COUP-TFII	Órfão
Gene 2 relacionado ao ErbA2	EAR-2	Órfão
Receptor de estrogênio	ER-alfa	Estradiol-17beta, tamoxifeno, raloxifeno
	ER-beta	Estradiol-17beta e vários compostos sintéticos
Receptor relacionado ao receptor de estrogênio	ERR-alfa	Órfão
	ERR-beta	Dietilestilbestrol e 4-OH tamoxifeno
	ERR-gama	Dietilestilbestrol e 4-OH tamoxifeno
Receptor de glicocorticoide	GR	Cortisol, dexametasona e RU486
Receptor de mineralocorticoide	MR	Aldosterona e espironolactona
Receptor de progesterona	PR	Progesterona, acetato de medroxiprogesterona e RU486
Receptor androgênico	AR	Testosterona e flutamida
Fator B induzido pelo fator de crescimento neural	NGFIB	Órfão
Fator 1 relacionado ao Nur	NURR-1	Órfão

(continua)

Quadro 3.1 Receptores nucleares e seus respectivos ligantes *(continuação)*

Nome	Abreviação	Ligante
Receptor 1 órfão derivado de neurônios	NOR-1	Órfão
Fator esteroidogênico 1	SF-1	Órfão
Proteína 1 homóloga ao receptor hepático	LRH1	Órfão
Fator nuclear de células germinativas	GCNF	Órfão
Gene 1 da região crítica DSS – hipoplasia adrenal congênita do cromossomo X	DAX-1	Órfão
Associado heterodimérico curto	SHP	Órfão

Fonte: adaptado de Gronemeyer et al.[16]

cados: PPAR-alfa, PPAR-beta/delta e PPAR-gama. Juntamente com o RXR — que é ativado pelo ácido retinoico 9-cis —, os PPAR formam heterodímeros e, por meio de sua ligação a uma região específica do DNA, denominada elemento de resposta ao proliferador de peroxissomos (PPRE, *peroxisome proliferation response element*), ativam a transcrição de diversos genes que codificam proteínas relacionadas, por exemplo, ao metabolismo lipídico, ao balanço energético, à inflamação e à homeostase da glicose. Quando os PPAR se ligam a agonistas, ocorre uma alteração conformacional que favorece a sua ligação a proteínas designadas coativadores transcricionais. Por outro lado, quando ligados a antagonistas, a alteração conformacional favorece a sua ligação a proteínas designadas correpressoras. Os ácidos graxos eicosapentaenoico (EPA) e docosa-hexaenoico (DHA) atuam como ligantes do PPAR e são, portanto, capazes de induzir a transcrição de genes envolvidos na homeostase lipídica e no metabolismo da glicose (Quadro 3.2).[20,21]

Outro receptor nuclear muito estudado é o VDR. Descoberto em 1974, esse receptor forma um heterodímero com o RXR, o qual se liga ao VDRE no DNA e, na presença de agonistas, liga-se a coativadores, promovendo a transcrição de genes alvo, os quais, por sua vez, são essenciais para o metabolismo ósseo, assim como para o crescimento, a diferenciação e a atividade funcional de diversas células, incluindo as do sistema imune, da pele e do pâncreas.[22]

Quadro 3.2 Receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPAR): principais locais de expressão, funções biológicas, ligantes naturais e classes de drogas utilizadas na clínica

	PPAR-alfa	PPAR-gama	PPAR-beta/delta
Órgãos/tecidos em que se expressam	Fígado Coração Rins Adrenais	Tecido adiposo Baço Adrenais Cólon	Diversos órgãos/tecidos
Células específicas em que se expressam	Endoteliais Macrófagos Musculares lisas	Macrófagos Células T	Diversos tipos celulares
Funções biológicas	Síntese e metabolismo de lipoproteínas ricas em triacilgliceróis Beta-oxidação Resposta anti-inflamatória	Diferenciação de adipócitos Homeostase da glicose Resposta anti-inflamatória	Biologia endotelial Utilização de energia Metabolismo lipídico
Ligantes	AGPI 8(S)-HETE	AGPI 15d-PGJ2 13-HETE 9-HODE	AGPI
Disfunções	Hipertrigliceridemia	Diabete melito tipo 2	Síndrome metabólica (?)
Fármacos	Fibratos	Tiazolidinedionas	

15d-PGJ2: 15-deoxi-delta^{12,14}-prostaglandina; AGPI: ácidos graxos poli-insaturados; HETE: ácido hidroxieicosatetraenoico; HODE: ácido hidroxioctadecadienoico; PPAR: proliferador de peroxissomos. **Fonte:** adaptado de Li e Glass.[21]

O receptor X de farnesoide (FXR, *farnesoid X receptor*) exerce função importante no que diz respeito à homeostase dos ácidos biliares, uma vez que atua como receptor desses ácidos e também como modulador essencial de uma variedade de processos relacionados ao metabolismo hepático do colesterol. O FXR é intensamente expresso no fígado e no intestino e, para ser ativado, deve necessariamente estar ligado ao RXR, formando um heterodímero, o qual se liga ao elemento de resposta ao FXR (FXRE, *FXR response element*). Os ácidos biliares se ligam a esse heterodímero, ativando o FXR, o que propicia o início da atividade transcricional. Uma das funções relevantes relacionadas à ativação do FXR refere-se à redução da expressão da enzima colesterol 7alfa-hidroxilase, limitante na síntese de ácidos biliares a partir do colesterol. Nesse contexto, o aumento da concentração de ácidos biliares induz a ativação do FXR, que, por sua vez, promove a ocorrência de um mecanismo de retroalimentação negativa, por meio da redução da expressão do gene que codifica a enzima colesterol 7alfa-hidroxilase.[23-25]

O receptor X hepático (LXR, *liver X receptor*) foi inicialmente classificado como órfão; no entanto, posteriormente, descobriu-se que era um receptor alvo de metabólitos do colesterol (oxisteróis). Há dois tipos de receptores LXR, codificados por genes distintos: LXR-alfa, mais comumente expresso no fígado e em macrófagos, e LXR-beta, expresso de forma ubíqua. O LXR combina-se com o RXR, formando um heterodímero, que se liga aos seus elementos de resposta (LXRE, *LXR response elements*) localizados na região promotora de genes alvo. A ligação do oxisterol ao LXR favorece a interação de coativadores com o heterodímero LXR/RXR, o que promove o início da transcrição de diversos genes, como o da proteína cassete de ligação ao ATP subfamília A membro 1 (ABCA1), que está envolvida no efluxo de colesterol de células como macrófagos para a apolipoproteína (Apo) A1, o que promove a formação de partículas de HDL em tecidos periféricos. Esse fato representa parte da via do transporte reverso do colesterol.[21,26]

Além disso, o LXR regula, direta e indiretamente, genes envolvidos no metabolismo de ácidos graxos, incluindo aqueles que codificam as enzimas ácido graxo sintase, acil CoA carboxilase e proteína 1C de ligação ao elemento regulatório de esteróis (SREBP-1C), bem como genes que controlam a secreção e o metabolismo de lipoproteínas ricas em triacilgliceróis, como aquele que codifica a enzima lipase de lipoproteínas. Ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 agem como antagonistas do LXR por competirem com os oxisteróis pela associação a ele, inibindo a transcrição de genes com ação lipogênica.[26-28]

Nesse sentido, verifica-se que diversos nutrientes são ligantes de receptores nucleares e, assim, exercem funções moleculares importantes na determinação do maior ou menor risco para DCNT. A seguir serão abordados dois exemplos fisiopatológicos importantes que ilustram a intricada relação entre nutrientes, CBA, expressão gênica e o equilíbrio saúde *versus* doenças. Mais detalhes poderão ser obtidos nos capítulos específicos.

NUTRIENTES, CBA, EXPRESSÃO GÊNICA E RELAÇÃO COM EQUILÍBRIO SAÚDE *VERSUS* DOENÇAS

Nutrigenômica, CBA e resposta pró-inflamatória na obesidade

Conforme mencionado previamente, CBA podem atuar indiretamente na regulação da expressão gênica e, assim, modular mecanismos fisiopatológicos e respostas relacionadas ao desenvolvimento de DCNT. Nesse sentido, pode-se destacar que a obesidade é uma DCNT que causa processo pró-inflamatório crônico de baixa intensidade, e diversos nutrientes e CBA têm sido estudados com relação à modulação desse processo, como é o caso do ácido cafeico (encontrado na erva-mate), do tirosol (encontrado no azeite de oliva), da quercetina (encontrada em frutas e hortaliças) e do licopeno (encontrado no tomate, na goiaba e na melancia). Esses compostos apresentam a capacidade de reduzir a expressão de genes como o da ciclo-oxigenase (COX) e da óxido nítrico sintase induzível (iNOS), por atuarem na redução da translocação do fator de nuclear NF-kB do citosol para o núcleo celular, reduzindo, portanto, a produção de citocinas pró-inflamatórias.[29]

Por exemplo, estudos *in vitro* têm revelado que o resveratrol reduz a expressão de citocinas pró-inflamatórias em células pulmonares estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) por atuar na redução da ativação dos fatores de transcrição NF-kB e da proteína ativadora 1 (AP-1). Similarmente, o resveratrol também atua na redução da ativação da quinase c-jun amino-terminal (JNK) e de sua proteína *upstream* denominada proteína quinase ativada por mitógeno (MEK), o que pode explicar o mecanismo de redução da ativação do fator de transcrição AP-1. Esse CBA também regula *in vitro* a expressão dos genes que codificam a COX-2 e a iNOS e as moléculas de adesão de superfície celular, como a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), a molécula de adesão de leucócitos endotelial 1 (ELAM-1) e a VCAM-1. Uma vez que os genes que codificam essas proteínas são regulados pelo NF-kB, é provável que o efeito anti-inflamatório do resveratrol seja decorrente de sua ação supracitada sobre a via de sinalização desse fator nuclear.[13,30]

Nutrigenômica e estresse oxidativo

O desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e os mecanismos de defesa antioxi-

dante do organismo caracterizam a ocorrência do estresse oxidativo, cujos efeitos podem ser associados a alterações e danos às estruturas celulares, aos ácidos nucleicos, aos lipídios e às proteínas. Entre as principais ERO destacam-se o ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$), o radical hidroxila ($OH^{\bullet -}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2).[31]

No contexto de nutrigenômica e estresse oxidativo, destaca-se o estudo do papel do fator de transcrição denominado NRF2 (*NF-E2-related factor 2*), expresso em todos os tecidos, no entanto, é encontrado mais abundantemente no cérebro, fígado, rins, sistema digestório e pele. Em condições metabólicas normais (Figura 3.5), o NRF2 está ligado à proteína inibitória conhecida como Keap-1 (*Kelch-like ECH-associated protein*), mais especificamente no domínio DGR. Essa ligação ocorre em duas regiões promotoras do NRF2: na DLG (que apresenta baixa afinidade à DGR) e na ETGE (que apresenta alta afinidade à DGR). Posteriormente, esse complexo é ubiquitinado e o NRF2 é então submetido à degradação no proteossoma 26S. Em condições normais, o NRF2 tem meia-vida de 20 minutos.[32] Entretanto, em condições de estresse oxidativo (Figura 3.6), a ligação entre o NRF2 e a Keap-1 é inibida pela perda da ligação nos domínios DLG e DGR, o que impede a sua ubiquitinação e degradação. Dessa forma, o NRF2 acumula-se e migra para o núcleo da célula, ligando-se a elementos de resposta a antioxidantes (ARE, *antioxidante response elements*) na região promotora dos genes que codificam enzimas e proteínas antioxidantes citoprotetoras, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase, a glutationa peroxidase (GPx), a glutationa redutase, as peroxirredoxinas, as quinona oxidorredutases e as heme-oxigenases, as quais, em conjunto, representam um potente

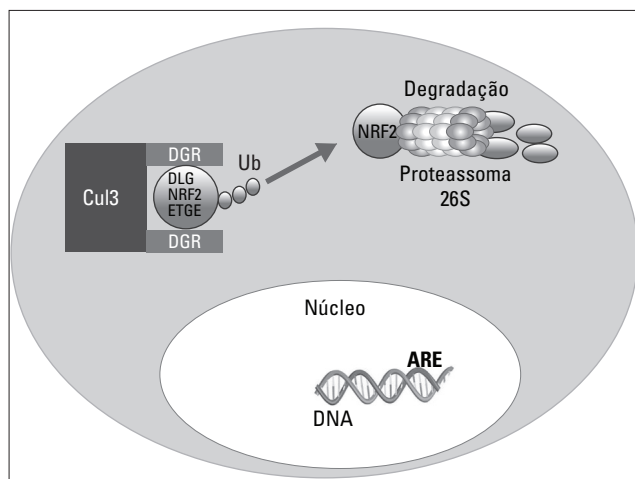



Figura 3.5 Expressão do NRF2 em condições metabolicamente normais. ARE: elemento de resposta a antioxidante; Cul3: *Cul3-based E3 ligase complex*; DLG: domínio DLG; DGR: *double glycine repeat*; ETGE: domínio ETGE; NRF2: *nuclear factor E2 related-factor*; Ub: ubiquitinação. **Fonte:** adaptada de Jung e Kwak.[32]

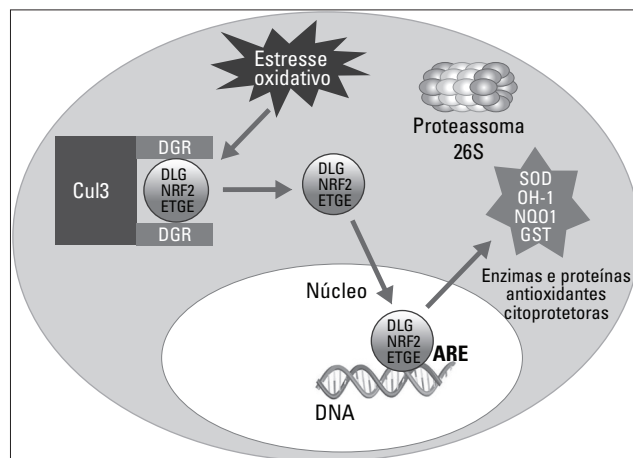



Figura 3.6 Expressão do NRF2 em condição de estresse oxidativo. ARE: elemento de resposta a antioxidante; Cul3: *Cul3-based E3 ligase complex*; DLG: domínio DLG; DGR: *double glycine repeat*; ETGE: domínio ETGE; GST: glutationa-S-transferase; NQO1: NAD(P)H quinona oxidorredutase; NRF2: *nuclear factor E2 related-factor*; OH-1: hidróxido de hidrogênio-1; SOD: superóxido dismutase. **Fonte:** adaptada de Jung e Kwak.[32]

mecanismo de defesa antioxidante. Posteriormente, o NRF2 é dissociado do núcleo pela Keap-1 e volta ao citoplasma, onde finalmente é ubiquitinado e degradado.[33]

Considerando que a ativação do NRF2 é responsável pela expressão de diversos genes que codificam enzimas e proteínas antioxidantes, a ingestão de compostos bioativos específicos presentes naturalmente nos alimentos, particularmente em frutas e hortaliças, pode ser considerada uma medida de redução dos prejuízos causados pelo estresse oxidativo. Estudos têm relatado que os isotiocianatos, as ditioltionas, o resveratrol, a curcumina, o ácido cafeico, a epigalocatequina-3-galato, o dialil sulfito, além de outros CBA, são capazes de ativar o NFR2 e, portanto, de melhorar a capacidade antioxidante do organismo.[34-36]

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização do Projeto Genoma Humano culminou no surgimento de uma gama de informações acerca do genoma, as quais estão sendo cada vez mais utilizadas no entendimento das interações existentes entre genes e fatores ambientais, com destaque para a alimentação e como elas estão relacionadas ao risco de surgimento ou à redução do risco de DCNT. A análise conjunta de aspectos de nutrigenômica, de nutrigenética e de epigenômica nutricional certamente tem melhorado os conhecimentos básicos sobre os mecanismos moleculares das doenças e de como padrões alimentares e outros hábitos de vida podem regular mecanismos fisiopatológicos essenciais. Os aspectos abordados especificamente em nutrigenômica estão também relacionados a benefícios importantes, como: a

descoberta de novos biomarcadores para doenças relacionadas à alimentação e para monitorar a eficácia de intervenções nutricionais; a determinação de genes e vias moleculares como alvos de prevenção; e o desenvolvimento de alimentos funcionais com base em conhecimento científico. A combinação dos resultados de estudos de nutrigenômica e de nutrigenética também tem sido aplicada na personalização da alimentação, com perspectivas ainda bastante promissoras, considerando o enorme espectro de interação entre nutrientes, CBA e genes. Todavia, essa é uma área em grande expansão e há necessidade de realização de muitos estudos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, para que seja possível a obtenção de conclusões mais precisas e para a efetiva aplicação dos resultados na prática clínica.

REFERÊNCIAS

1. Menon B, Harinarayan CV, Raj MN, Vemuri S, Himabindu G, Afsana TK. Prevalence of low dietary calcium intake in patients with epilepsy: a study from South India. Neurol India. 2010;58:209-12.
2. Naushad SM, Radha A, Devi R. Role of parental folate pathway single nucleotide polymorphisms in altering the susceptibility to neural tube defects in South India. J Perinat Med. 2010;38:63-69.
3. Hendriks HFJ. Use of nutrigenomics endpoints in dietary interventions. Proceedings of the Nutrition Society. 2013;72:348-51.
4. Neeha VS, Kinth P. Nutrigenomics research: a review. J Food Sci Technol. 2013;50(3):415-28.
5. Kaput J, Rodriguez RL. Nutritional genomics: the next frontier in the postgenomic era. Physiol Genomics. 2004;16:166-77.
6. Cousins RJ. Nutritional regulation of gene expression. Am J Med. 1999;25;106(1A):20S-23S.
7. McGrane MM. Vitamin A regulation of gene expression: molecular mechanism of a prototype gene. J Nutr Biochem. 2007;18(8):497-508.
8. Nagpal S, Na S, Rathnachalam R. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. Endocr Rev. 2005;26(5):662-87.
9. Rist MJ, Wenzel U, Daniel H. Nutrition and food science go genomic. Trends Biotechnol. 2006;24(4):172-78.
10. Jacobs MD, Harrison SC. Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex. Cell. 1998;95(6):749-58.
11. Marui N, Offermann MK, Swerlick R, Kunsch C, Rosen CA, Ahmad M et al. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. J Clin Invest. 1993;92(4):1866-74.
12. Csiszar A, Smith K, Labinskyy N, Orosz Z, Rivera A, Ungvari Z. Resveratrol attenuates TNF-alpha-induced activation of coronary arterial endothelial cells: role of NF-kappaB inhibition. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006;291(4):H1694-9.
13. Aggarwal BB, Shishodia S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. Biochem Pharmacol. 2006; 71(10):1397-1421.
14. Berná G, Oliveras-López MJ, Jurado-Ruíz E, Tejedo J, Bedoya F, Soria B et al. Nutrigenetics and nutrigenomics insights into diabetes etiopathogenesis. Nutrients. 2014;6:5338-69.
15. Olefsky JM. Nuclear receptor minireview series. J. Biol. Chem. 2001;276(40):36863-64.
16. Gronemeyer H, Gustafsson J, Laudets V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. Nat Rev Drug Discov. 2004;3:950-64.
17. Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. Science. 2001;294:1866-1870.
18. [NRC] Nuclear Receptors Committee. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. Cell. 1999;97:161-63.
19. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 5.ed. New York: Garland Science; 2008. 1268p.
20. Moreno M, Lombardi A, Silvestri E, Senese R, Cioffi F, Goglia F et al. PPARs: nuclear receptors controlled by, and controlling, nutrient handling through nuclear and cytosolic signaling. PPAR Res. 2010;pii 435689.
21. Li AC, Glass CK. PPAR- and LXR-dependent pathways controlling lipid metabolism and the development of atherosclerosis. J Lipid Res. 2004;45:2161-73.
22. Carlberg C. Genome-wide (over)view on the actions of vitamin D. Front Physiol. 2014;29;5:167.
23. Gadaleta RM, Cariello M, Sabbà C, Moschetta A. Tissue-specific actions of FXR in metabolism and cancer. Biochim Biophys Acta. 2015;1851:30-39.
24. Hollman DA, Milona A, van Erpecum KJ, van Mil SW. Anti-inflammatory and metabolic actions of FXR: insights into molecular mechanisms. Biochim Biophys Acta. 2012;1821:1443-52.
25. Koutsounas I, Giaginis C, Theocharis S. Farnesoid X Receptor (FXR) from normal to malignant state. Histol Histopathol. 2012;27:835-53.
26. Bełtowski J. Liver X receptors (LXR) as therapeutic targets in dyslipidemia. Cardiovasc Ther. 2008;26:297-316.
27. Bonamassa B, Moschetta A. Atherosclerosis: lessons from LXR and the intestine. Trends Endocrinol Metab. 24:120-128, 2013.
28. Calkin AC, Tontonoz P. Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR. Nat Rev Mol Cell Biol. 2012;13:213-224.
29. Dalmiel L, Vargas T, Molina AR. Nutritional genomics for the characterization of the effect of bioactive molecules in lipid metabolism and related pathways. *Electrophoresis Journal.* 2012;33:2266-89.
30. Rahman I, Biswas SK, Kirkham PA. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. Biochem Pharmacol. 2006;72:1439-52.
31. Tangvarasittichai S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. World J Diabetes. 2015;6:456-80.
32. Jung K, Kwak M. The Nrf2 system as a potential target for the development of indirect antioxidants. Molecules. 2010;15:7266-91.
33. Zhang DD, Hannink M. Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. Mol Cell Biol. 2003;23:8137-51.
34. Barbagallo I, Galvano F, Frigiola A, Cappello F, Riccioni G, Murabito P et al. Potential therapeutic effects of natural heme oxygenase-1 inducers in cardiovascular diseases. Antioxid Redox Signal. 2013;18:507-21.
35. Costa G, Francisco V, Lopes MC, Cruz MT, Batista MT. Intracellular signaling pathways modulated by phenolic compounds: application for new anti-inflammatory drugs discovery. Curr Med Chem. 2012;19(18):2876-2900.
36. Stefanson AL, Bakovic M. Dietary regulation of Keap1/Nrf2/ARE pathway: focus on plant-derived compounds and trace minerals. Nutrients. 2014;6(9):3777-801.

Fundamentos da nutrigenética

4

Cristiane Cominetti
Marcelo Macedo Rogero
Maria Aderuza Horst

INTRODUÇÃO

Acredita-se que o termo nutrigenética, do ponto de vista histórico, esteja relacionado ao provérbio "*Ut quod ali cibus est aliis fuat acre venenum*" ("o que é alimento para um é para outros veneno amargo"), do poeta e filósofo romano Tito Lucrécio Caro (99 a.C.-55 a.C.). Posteriormente, em meados do século XX, pesquisadores verificaram que maior taxa de sobrevivência de camundongos Swiss Webster infectados por *S. enteritidis* foi obtida com a ingestão de dieta composta de trigo integral e leite em pó integral em comparação a uma dieta sintética, de acordo com a constituição genética dos animais utilizados. Em 1975, o termo nutrigenética foi utilizado no título de um livro escrito por Brennan e Mulligan (*Nutrigenetics: new concepts for relieving hypoglycemia*) e, a partir de 1980, as tecnologias necessárias para a investigação da expressão de genes específicos e de variações na sequência de nucleotídeos do ácido desoxirribonucleico (DNA) associadas às diferentes respostas a componentes da alimentação foram constantemente desenvolvidas e aperfeiçoadas.[1]

No contexto da genômica nutricional, a nutrigenética representa a influência da variabilidade genética existente entre os indivíduos sobre as necessidades nutricionais, o estado de saúde e o risco de desenvolvimento de doenças.[2] A nutrigenética tem como foco o estudo dos efeitos de variações no DNA, como polimorfismos de nucleotídeo único (SNP), variações de números de cópias (CNV) e inserções e deleções (INDEL) nas respostas biológicas à ingestão energética, de micro e macronutrientes e de compostos bioativos de alimentos (CBA).[1]

Um exemplo clássico utilizado em nutrigenética é a fenilcetonúria, erro inato do metabolismo, de caráter autossômico recessivo raro (≈ 1:15.000 indivíduos), causado por mutações no gene que codifica a enzima fenilalanina hidroxilase. Aproximadamente 20 anos após sua descoberta, em meados do século XX, verificou-se que os pacientes acometidos pela doença respondiam à restrição alimentar do aminoácido essencial fenilalanina. A fenilcetonúria pode ser classificada, de acordo com a tolerância à fenilalanina antes dos cinco anos de idade, em clássica, moderada, leve e em hiperfenilalaninemia leve, sendo a primeira condição a mais grave, quando ocorre deficiência completa ou quase completa da atividade da fenilalanina hidroxilase e os indivíduos afetados toleram quantidades inferiores a 250 a 350 mg de fenilalanina por dia para manutenção das concentrações plasmáticas seguras do aminoácido.[3] Este foi, portanto, o primeiro erro inato do metabolismo causado por alterações em um único gene que respondeu ao tratamento alimentar, caracterizando uma intervenção relacionada à nutrigenética.[4]

Todavia, ao contrário da fenilcetonúria, doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) – como obesidade, diabete melito tipo 2, doenças cardiovasculares (DCV), hipertensão arterial e câncer – são multifatoriais e multigênicas. Nesses casos, o fenótipo é determinado pela interação entre múltiplos genes, variações genéticas e fatores ambientais. Nesse contexto, o presente capítulo descreve os conceitos básicos e alguns exemplos de estudos de nutrigenética, visando a auxiliar o leitor na compreensão de capítulos mais específicos que compõem o livro.

PROJETO GENOMA HUMANO, PROJETO INTERNACIONAL HAPMAP E PROJETO 1.000 GENOMAS

A data de 25 de abril de 1953 é considerada o nascimento da Biologia Molecular moderna, em razão da publicação dos resultados acerca da estrutura molecular dos ácidos desoxirribonucleicos, determinada a partir de ex-

perimentos realizados por James Dewey Watson, Francis Harry Compton Crick, Maurice Hugh Frederick Wilkins, Rosalind Franklin e colaboradores.[5] Por tais resultados, os três primeiros cientistas foram laureados com o Prêmio Nobel na categoria "Medicina ou Fisiologia", em 1962. Franklin não recebeu o prêmio pois faleceu prematuramente ao 37 anos de idade em razão de um câncer de ovário, provavelmente desencadeado pela exposição a raios-X, em experimentos que geraram as imagens que possibilitaram a confirmação da teoria da estrutura em alfa hélice da molécula de DNA.

A descoberta da estrutura em dupla hélice do DNA foi a primeira etapa crucial para as análises moleculares do genoma humano. Alguns anos mais tarde, em meados da década de 1970, Frederick Sanger desenvolveu técnica para o sequenciamento do DNA, a qual ficou conhecida como "método Sanger" e possibilitou o início das discussões acerca da análise do genoma humano completo, iniciadas na década de 1980. Em 1986, o Departamento de Energia americano se envolveu nestas discussões e estabeleceu o primeiro projeto no ano seguinte. James Watson foi o primeiro líder do Centro Nacional para Pesquisas do Genoma Humano (NHGRI do inglês National Center for Human Genome Research), uma divisão do Instituto Nacional de Saúde (NIH do inglês National Institutes of Health), seguido por Michael M. Gottesman e Francis Sellers Collins.[6]

Formalmente, o Projeto Genoma Humano (PGH) foi iniciado em 1990, com a publicação de um plano com as metas de pesquisa para os próximos cinco anos, o qual, em função dos grandes avanços tecnológicos, foi atualizado ainda em 1993 e, novamente, em 1998. A metodologia empregada foi baseada no sequenciamento do genoma completo (Whole Genome Sequencing). Por essa razão, o PGH obteve dados de alta qualidade e precisão, inclusive para as porções do DNA que não contêm genes. De acordo com diferentes fontes, o valor total empregado no PGH foi em torno de três a 53 bilhões de dólares.[7]

Em 1998, o cientista J. Craig Venter, ex funcionário do NHI, anunciou a abertura de sua nova empresa, chamada Celera Genomics, e declarou que sequenciaria o genoma humano em três anos por 300 milhões de dólares. Para tanto, optou-se por um método mais objetivo: sequenciamento por shotgun (whole genome "shotgun" sequencing), a qual é uma metodologia mais rápida, evidentemente, porém menos precisa.[7]

Em meados do ano 2000, foi anunciado que a maior parte do sequenciamento do genoma humano estava completa e, em 2001, foram publicados os resultados referentes a 90% da sequência dos cerca de três bilhões de pares de nucleotídeos do DNA humano, obtidos pelo PGH e pelo consórcio Celera simultaneamente, nas revistas científicas Nature e Science, respectivamente. Entretanto, apesar do número de nucleotídeos ser semelhante, apenas menos da metade das sequências eram concordantes entre os dois relatos.[8]

Em 2003, o grupo de pesquisa do Instituto J. Craig Venter publicou a sequência completa do genoma do próprio pesquisador Craig Venter. A grande revolução nesse novo trabalho foi a de que o genoma avaliado correspondia ao genoma diplóide, contendo a informação de cada par de cromossomo herdado dos pais, ao contrário da sequência determinada pelo Projeto Genoma, que correspondia ao genoma haplóide. Como resultado, descobriu-se que a semelhança das sequências genéticas entre dois indivíduos é de 99,5% e não de 99,9% como se imaginava ao fim do PGH.

Em 2004, foram publicados os resultados completos, ressaltando que o genoma humano é composto por aproximadamente 20 a 25 mil genes e que a sequência de bases se configuraria em um alicerce sólido para investigações biomédicas das próximas décadas.[6,9,10,11]

Um dos principais desafios apontados nas conclusões da publicação dos resultados completos do Projeto Genoma Humano (PGH) foi a necessidade de identificação sistemática de todos os polimorfismos genéticos encontrados na população, com o objetivo de facilitar o estudo de suas associações com doenças, o que demandaria a avaliação de centenas a milhares de genomas humanos.[11]

Nesse sentido, foi lançado em 2002 o Projeto Internacional HapMap, que teve como metas determinar padrões comuns de variações na sequência de DNA no genoma humano e disponibilizar tais informações em domínio público. Tais objetivos foram alcançados por meio da determinação dos genótipos de cerca de um milhão de sequências variantes em amostras de DNA de populações com ancestralidade de regiões da África, Ásia e Europa, da determinação de suas frequências e do grau de associação entre elas, permitindo a descoberta de variações genéticas que influenciam o surgimento de doenças comuns e facilitando o desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico e a capacidade de escolher alvos para intervenções terapêuticas.[12]

No início de 2008, foi lançado o Projeto 1.000 Genomas, com o objetivo de descobrir, genotipar e fornecer informações acuradas de haplótipos* de todas as formas de polimorfismos do DNA humano, caracterizando, especificamente, mais de 95% das variações em regiões genômicas acessíveis às tecnologias de sequenciamento e que apresentam frequência de 1% ou superior em pelo

* Haplótipo: regiões que contém variações genéticas próximas umas das outras e que tendem a ser herdadas em conjunto.

menos 1.000 indivíduos dos maiores grupos de populações – Europa, Ásia, África e Américas. Os resultados do projeto piloto foram publicados em 2010 e, em 2012, foi anunciado o sequenciamento do genoma de 1.092 indivíduos de 14 populações, revelando dados importantes, como um mapa de 38 milhões de SNP, de 1,4 milhão de pequenas inserções e deleções e de mais de 14 mil grandes deleções. Os resultados mostraram, ainda, que indivíduos de diferentes populações carreiam perfis diferenciados de variações comuns e raras e que variações de baixa frequência mostram diferenciação geográfica substancial.[13,14]

CONCEITOS BÁSICOS EM NUTRIGENÉTICA

O corpo humano é formado por trilhões de células e, com exceção dos eritrócitos e das plaquetas, todas apresentam núcleo e, por consequência, o DNA. O DNA contém todas as instruções que direcionam as atividades celulares e é formado pelas bases nitrogenadas purínicas (adenina e guanina) e pirimidínicas (citosina e timina), ligadas a uma molécula de desoxirribose e a um grupamento fosfato. Essa formação composta de base nitrogenada, açúcar e fosfato dá origem aos grupamentos conhecidos como nucleotídeos. A molécula de DNA tem estrutura de dupla fita e os nucleotídeos apresentam pareamento específico (adenina com timina e citosina com guanina), conhecido como complementaridade das bases, o qual garante a preservação fidedigna do código genético durante a replicação celular. Acredita-se que o genoma humano seja composto de 3,2 bilhões de pares de nucleotídeos enovelados em octâmeros de histonas e organizados em 23 pares de cromossomos, sendo 22 deles autossômicos ou somáticos (não relacionados ao sexo) e um sexual (XX mulher ou XY homem).[15,16]

Os genes são as estruturas funcionais da hereditariedade e podem ser definidos como segmentos de DNA que codificam a informação necessária para a produção de um produto biológico funcional, que pode ser uma cadeia polipeptídica ou um ácido ribonucleico (RNA) com ações catalíticas ou estruturais. Um gene apresenta duas grandes regiões específicas, a regulatória e a codificadora. A primeira está relacionada ao controle da expressão gênica e pode ser dividida basicamente em *enhancer/silencer** e promotor. A região codificadora é composta de éxons e íntrons; estes últimos não codificam nenhuma mensagem e são removidos durante o processamento do pré-RNAm (Figura 4.1). Os éxons contêm os códigos que darão origem aos aminoácidos e, ao final, às proteínas.[16,17]

A sequência de eventos necessária para que ocorra a síntese de uma proteína é direcionada pela teoria do dogma central, proposta por Francis Crick em 1958 e publicada em 1970. De acordo com ela, a primeira etapa para a síntese de uma proteína é a transcrição da informação contida em determinada região do DNA em uma estrutura mais simples, a molécula de RNA (transcrito primário). Esse processo depende da participação de uma série de fatores de transcrição (gerais e específicos) e da enzima RNA polimerase II, que se liga à região promotora do gene, separando a dupla hélice e movimentando-se na fita molde no sentido 3' para 5' até a região de terminação. Depois de catalisar a inserção de cada nucleotídeo, a RNA polimerase II revisa a molécula de RNA recém-sintetizada e a dupla hélice de DNA retorna à forma helicoidal. Chegando à região de terminação, a enzima se separa da fita molde de DNA liberando a molécula de RNA recém-produzida, a qual passará por processamento (adição de cauda poli A, capeamento e *splicing)* visando à formação do RNA mensageiro (RNAm) maduro; este deixa o núcleo celular em direção ao citoplasma e, nos ribossomos, decodifica a informação, em um processo denominado tradução (mais detalhes podem ser encontrados nos Capítulos 1 e 2).[15-17]

A informação codificada pelo RNAm é traduzida em proteínas pela leitura do código a cada três nucleotídeos. Cada sequência de três nucleotídeos, conhecida como códon, dará origem a um aminoácido. Entretanto, como existem quatro bases nitrogenadas, que são combinadas de três em três, resultando em 64 possibilidades de combinação (4^3), diferentes códons podem codificar um mesmo aminoácido, e ainda três códons de parada, ou *stop* códons, que indicam para o ribossomo o momento em que a leitura do RNAm deve ser encerrada (Figura 4.2). Essa constatação refere-se à teoria da degeneração ou ambiguidade do código genético.[16,17]

A ambiguidade do código genético tem influência importante na nutrigenética, que pode ser entendida como o estudo de pequenas variações na sequência de nucleotídeos do DNA, que podem interferir positiva ou negativamente em vias metabólicas, determinando de que maneira os indivíduos responderão à ingestão de nutrientes ou CBA e a diferentes padrões de alimentação. Sabe-se, por meio de resultados de estudos intervencionais, que existe grande variabilidade interindividual nas respostas metabólicas às mudanças no padrão alimentar, ou seja, muitos indivíduos não apresentam alterações importantes, enquanto outros podem ser extremamente sensíveis a tais modificações.[18]

* *Enhancer*: região do DNA em que fatores de transcrição podem se ligar e ativar o processo de transcrição. *Silencer*: região do DNA em que fatores de transcrição podem se ligar e reprimir a transcrição.

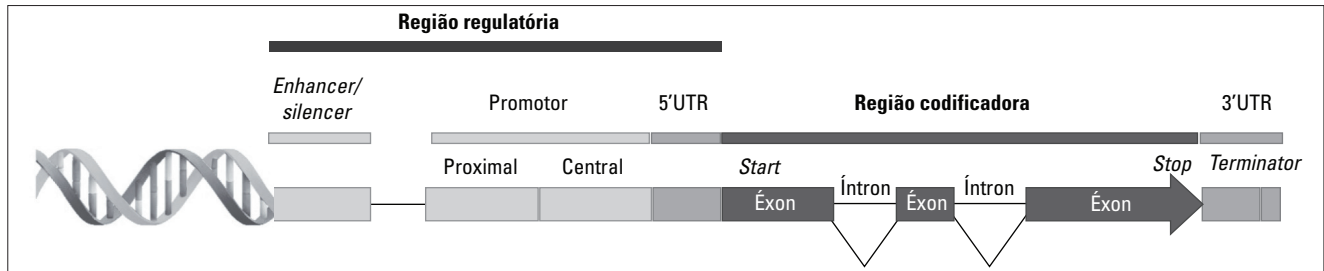



Figura 4.1 Estrutura de um gene. 3'UTR: região 3' não traduzida; 5'UTR: região 5' não traduzida; *start*: ponto de início da transcrição; *stop:* ponto de término da transcrição; *terminator*: região que demarca o final de um gene. **Fonte:** adaptada de Nelson e Cox.[17]

UUU	Phe	UCU		UAU	Tyr	UGU	Cys
UUC		UCC	Ser	UAC		UGC	
UUA	Leu	UCA		**UAA**	*stop*	**UGA**	*stop*
UUG		UCG		**UAG**	*stop*	UGG	Trp
CUU		CCU		CAU	His	CGU	
CUC	Leu	CCC	Pro	CAC		CGC	Arg
CUA		CCA		CAA	Gln	CGA	
CUG		CCG		CAG		CGG	
AUU		ACU		AAU	Asn	AGU	Ser
AUC	Ile	ACC	Thr	AAC		AGC	
AUA		ACA		AAA	Lys	AGA	Arg
AUG	Met	ACG		AAG		AGG	
GUU		GCU		GAU	Asp	GGU	
GUC	Val	GCC	Ala	GAC		GGC	Gly
GUA		GCA		GAA	Glu	GGA	
GUG		GCG		GAG		GGG	

Figura 4.2 Degeneração ou ambiguidade do código genético: alguns aminoácidos podem ser codificados por mais de um códon. Ala: alanina; Arg: arginina; Asn: asparagina; Asp: aspartato; Cys: cisteína; Gln: glicina; Glu: ácido glutâmico; Gly: glicina; His: histidina; Ile: isoleucina; Leu: leucina; Lys: lisina; Met: metionina (códon de início da tradução); Phe: fenilalanina; Pro: prolina; Ser: serina; *Stop*: códon de término da tradução; Thr: treonina; Trp: triptofano; Tyr: tirosina; Val: valina. **Fonte:** adaptada de Nelson e Cox.[17]

Um dos resultados de destaque do PGH foi a constatação de que o genoma de seres humanos tem sequência de nucleotídeos cerca de 99,9% idêntica, ou seja, todas as diferenças genéticas entre as pessoas, como cor dos olhos, tipo sanguíneo, composição corporal e risco para o desenvolvimento de DCNT, são determinadas por 0,1% de variações genéticas.[19,20]

Em 2007 foi publicada a primeira sequência de genoma diploide, conforme descrito anteriormente. Esse trabalho, contendo a informação de cada par de cromossomo herdado dos pais (diferente das primeiras publicações que correspondem ao genoma haploide, ou seja, de apenas um cromossomo), concluiu que a semelhança das sequências genéticas entre dois indivíduos é de 99,5% e não de 99,9% como descrito no PGH.[20]

As formas alternativas de um gene são chamadas de alelos e as diferenças fenotípicas entre indivíduos são determinadas por pequenas variações genéticas, que, quando ocorrem em uma frequência relativamente alta (em mais de 1% dos indivíduos de uma população), são conhecidas como polimorfismos, do latim *poli* = muitas; *morfismo* = formas. Existem alguns tipos de polimorfismos – como os microssatélites ou VNTR (*variable number of tandem repeats*), os polimorfismos INDEL e os SNP, o tipo mais comum de variação encontrada no genoma (cerca de 90% de todas as variações) – no qual ocorre a troca de apenas um nucleotídeo em uma posição específica do DNA, que pode ou não ser uma região codificadora (Figura 4.3).[2] Quando a troca de nucleotídeo ocorre em um éxon, pode resultar ou não em alteração da proteína traduzida, em função da degeneração do código genético. Quando a troca de nucleotídeo resulta no mesmo aminoácido, o SNP é conhecido como sinônimo ou silencioso, pois não altera a proteína traduzida (p. ex., GUC → GU**A**; ambos codificam o aminoácido valina). Caso a variação resulte em um códon que dará origem a um aminoácido diferente, o SNP é conhecido como não sinônimo ou *missense* (p. ex., UUA → U**C**A, em que o primeiro codifica uma leucina e o segundo, uma serina). Outra possibilidade é a troca de nucleotídeo resultar em um códon de terminação da tradução ou *stop* códon, dando origem a um SNP conhecido como *nonsense* (p. ex., UAU → UA**G**, em que o primeiro codifica uma tirosina e o segundo é um *stop* códon).

Entretanto, um polimorfismo pode não ocorrer apenas em éxons, mas ao longo de toda a molécula de DNA, inclusive na região promotora do gene, o que pode influenciar a regulação da expressão gênica, tanto positiva quanto negativamente. Podem ocorrer SNP também em

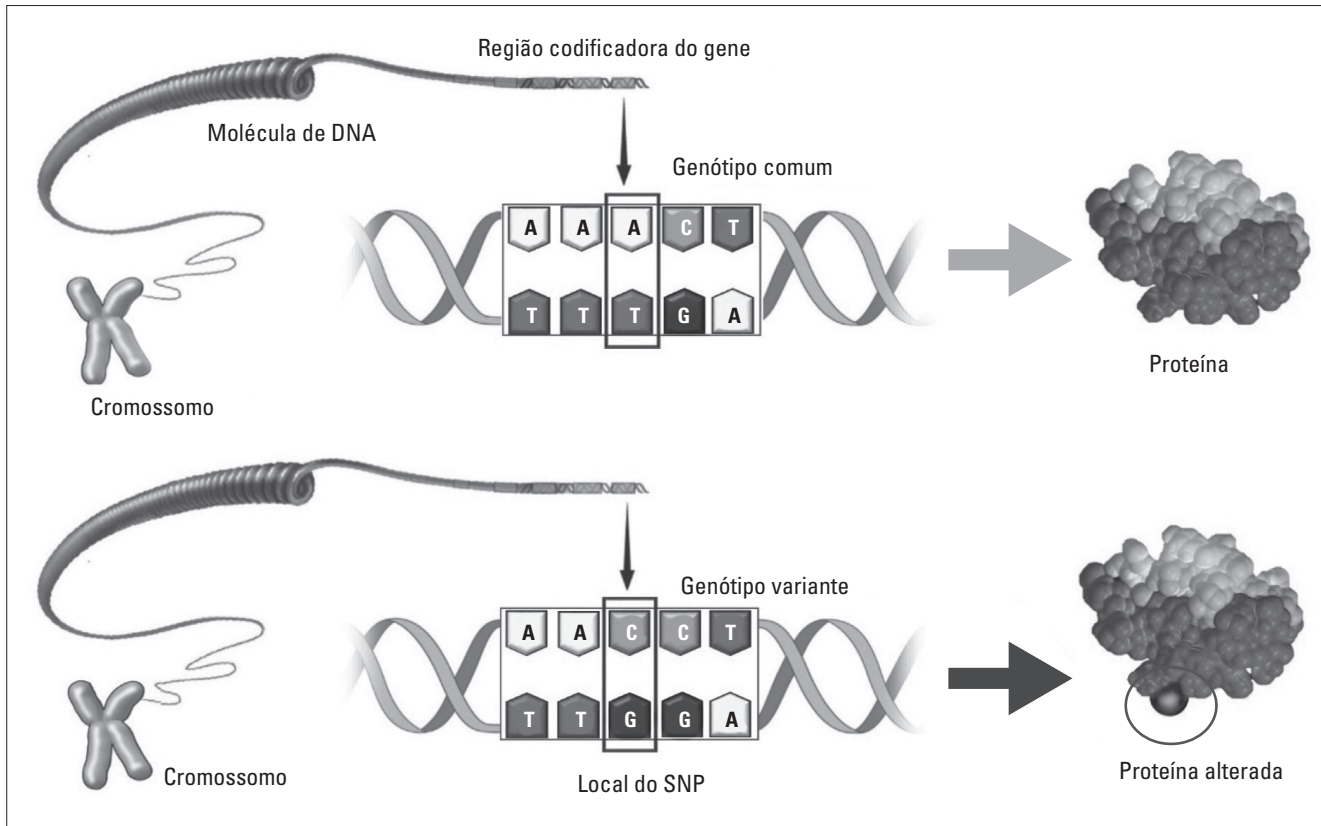



Figura 4.3 Polimorfismo de nucleotídeo único: variações em nucleotídeos na sequência do DNA. No desenho estão ilustrados dois exemplos de genótipos; no "comum", apresenta-se um códon AAA, que é transcrito em UUU no RNAm, que codifica uma fenilalanina. No "genótipo variante", no último nucleotídeo do códon exemplificado, houve a troca da adenina (A) pela citosina (C). O códon AAC será transcrito em UUG no RNAm, dando origem ao aminoácido leucina, o que promove alteração na proteína traduzida. **Fonte**: adaptada de Camp e Trujillo.[2]

íntrons e, mesmo essas estruturas não codificando aminoácidos, tais variações podem interferir na síntese da proteína, por meio de modificações no processo de *splicing* alternativo*.[2,15,21] Ainda, a amplitude do impacto biológico de um SNP dependerá também do fato deste ocorrer em homozigose ou em heterozigose. Muitas vezes, a presença de apenas um alelo variante já é suficiente para determinar efeitos de proteção ou de aumento do risco em função do polimorfismo.

A nomenclatura de um SNP pode ser ditada de algumas maneiras. Em primeiro lugar, a grande maioria dos SNP é catalogada em um banco de dados público (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/), sob um número de registro (*rs – register number*, por exemplo rs1800629). Além desse registro, outra forma de nomear um SNP é pontuando a troca de nucleotídeo e a posição do DNA em que esta ocorre, seguida da descrição dos nucleotídeos envolvidos (p. ex., o rs1800629 refere-se a uma troca de G por A na posição 4682, portanto 4682G>A). Caso o SNP ocorra na região promotora do gene, indica-se com um sinal de menos à frente da troca (–308 G>A). Ainda, como polimorfismos que ocorrem em éxons podem alterar a sequência de aminoácidos codificados, essa mudança também pode ser utilizada para identificar o polimorfismo. Por exemplo, um SNP que ocorre no gene da glutationa peroxidase 1 (GPx1) está catalogado sob o rs1050450 e refere-se a uma troca de nucleotídeo (citosina por timina) na posição 593 do DNA. Essa troca resulta na codificação de uma leucina em vez de uma prolina no códon 198. Portanto, esse polimorfismo pode ser nomeado como rs1050450 ou C593T (593C>T) ou Pro198Leu. Quando o SNP ocorrer na região promotora ou em um íntron, haverá apenas a nominação referente à troca de nucleotídeo em determinada posição do DNA. Por exemplo, o rs6721961 refere-se ao SNP –617C>A na região promotora do gene que codifica o fator de transcrição Nrf2 (*nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*), relacionado ao sistema antioxidante. Já o rs894160 é o número de registro de um polimorfismo que ocorre em um íntron localizado no gene da perilipina e também pode ser nomeado co-

* *Splicing* alternativo: processo regulatório que ocorre durante a expressão gênica que pode resultar na tradução de produtos diferentes a partir de um mesmo gene.

mo 11482G>A, referindo-se à posição do DNA em que ocorre a troca de uma guanina por uma adenina.

Conforme mencionado anteriormente, o Projeto Internacional 1.000 Genomas revelou que o genoma humano apresenta 38 milhões de possibilidades de SNP e, nesse contexto, estima-se que, como o genótipo de cada indivíduo apresenta uma variação a cada 100 ou 300 nucleotídeos, uma pessoa pode apresentar um subconjunto de até 3 milhões de SNP. Todavia, é importante distinguir quais, dentre tantos SNP, têm realmente importância do ponto de vista da nutrição. Gillies[22] sugere que alguns pontos sejam considerados na determinação dos SNP de maior interesse em estudos de nutrigenética:

- Devem se encontrar em genes que respondem à alimentação e que são ativados cronicamente nas doenças.
- Devem se encontrar em genes que codificam proteínas consideradas essenciais no metabolismo e que apresentem papel hierárquico nas cascatas biológicas.
- Devem ter consequências funcionais importantes.
- Devem ter alta prevalência na população de interesse.
- Devem se encontrar em genes com biomarcadores associados.

Polimorfismos específicos de doenças e responsivos a intervenções nutricionais podem ser considerados fundamentais para o estabelecimento de recomendações nutricionais baseadas no genótipo, com vistas à promoção da saúde e redução do risco do desenvolvimento de DCNT. Para identificação de variações genéticas de interesse podem ser adotadas diferentes estratégias de estudos. Dois exemplos são a abordagem baseada em genes candidatos e a utilização de estudos de associação ampla do genoma (GWAS), que serão descritas a seguir.

ABORDAGEM BASEADA EM GENES CANDIDATOS

Princípios e aplicação

Estudos de nutrigenética com abordagem em genes candidatos se baseiam na identificação de variantes de risco associadas com determinada doença, ou seja, têm foco na seleção de genes que tenham sido, em alguma extensão, previamente relacionados à doença e que então forneçam informações sobre suas funções. Essa abordagem se inicia com a seleção do gene candidato com base em sua relevância no mecanismo da doença e, em seguida, avaliam-se e selecionam-se *tag* SNP* ou SNP com consequências funcionais sobre a regulação do gene ou sobre a função da proteína traduzida. Por fim, verifica-se a associação da variante genética com a doença em questão, por meio da observação da ocorrência em indivíduos que a apresentam (casos) e em indivíduos controle.[23]

Nas décadas de 1990 e 2000, muitos estudos de abordagem baseada em genes candidatos revelaram aspectos importantes dos efeitos de variações genéticas no metabolismo, nas necessidades de nutrientes e no risco de desenvolvimento de doenças. De forma geral, estudos epidemiológicos em nutrição têm particular importância, uma vez que analisam os efeitos da exposição dietética e das variações genéticas em humanos. A análise de polimorfismos em estudos epidemiológicos tem auxiliado a resolver diversas limitações inerentes a esses estudos.[24] Como exemplo, pode-se citar a relação entre a ingestão de café e o risco para DCV, que mostra-se diferenciada em muitos estudos, estando associada com o aumento do risco em alguns indivíduos e com a ausência de efeitos ou, até mesmo, com risco reduzido em outros indivíduos, principalmente em razão do conteúdo de cafeína dessa bebida. Estudos de nutrigenética demonstram que tais diferenças de resposta são atribuídas à presença de um alelo variante (do gene responsável por codificar a enzima CYP1A2) que faz que os indivíduos sejam classificados em metabolizadores rápidos ou lentos da cafeína, e essa característica influencia o risco cardiovascular, maior nos metabolizadores lentos.[25]

Vários outros genes candidatos são conhecidos por influenciar diversos processos fisiológicos, como absorção, transporte, biotransformação, utilização, ligação, estoque e excreção, bem como mecanismos celulares de ação de diversos nutrientes ou CBA e, assim, a forma como eles interferem na relação entre saúde e doença. Cada gene envolvido em todos esses processos pode apresentar polimorfismos que alteram sua função e as respostas fisiológicas a determinado composto alimentar. A seguir são destacados alguns exemplos importantes de polimorfismos fortemente relacionados à alimentação.

Gene da metilenotetra-hidrofolato redutase, metabolismo do folato e risco cardiovascular

Os ciclos do folato e da metionina compartilham algumas etapas, das quais a metilenotetra-hidrofolato redutase (MTHFR) participa catalisando a conversão do

---

* *Tag* SNP: um ou mais SNP importantes em uma região do genoma com alto desequilíbrio de ligação que representam um grupo de SNP herdado em conjunto, conhecido como haplótipo.

5-10 metiltetra-hidrofolato em 5-metiltetra-hidrofolato, para posterior doação de um grupamento metil para a homocisteína, de forma que esta possa ser regenerada em metionina.[26]

Entre as variações genéticas mais estudadas no gene da MTHFR está o polimorfismo rs1801133 ou C677T (troca de uma citosina por uma timina na posição 677 do gene, que promove a codificação do aminoácido valina em vez de alanina no códon 222).[27,28] Esse SNP resulta em uma MTHFR mais termolábil, com menor atividade enzimática (aproximadamente 30% menor nos indivíduos carreadores do genótipo heterozigoto e 65% menor naqueles homozigotos para o alelo variante T) e tem sido relacionado à elevação da concentração plasmática de homocisteína e à redução do ácido fólico plasmático.[29]

Além da importância dessa variação genética nas concentrações de ácido fólico e, portanto, no padrão de metilação global do DNA e suas consequências, evidências também sugerem associação entre as concentrações aumentadas de homocisteína em função de polimorfismos no gene da MTHFR com o desenvolvimento de DCV.[30] Metanálise que incluiu mais de 70 estudos caso-controle (n=16.849) revelou que indivíduos homozigotos variantes em relação ao SNP MTHFR C677T apresentaram risco 21% maior de desenvolver doença isquêmica do miocárdio. Além disso, por meio da avaliação de outros 20 estudos prospectivos (n=3.820), observou-se que um aumento de 5 μmol/mL nas concentrações sanguíneas de homocisteína acarretou risco 23% maior de surgimento de doença isquêmica do miocárdio.[31]

Entre os fatores de risco cardiovascular, além da hiper-homocisteinemia, as dislipidemias têm fundamental importância, considerando-se sua relevância na formação da placa aterosclerótica. Diversos SNP têm sido associados a essa condição clínica. Entre os genes envolvidos com o metabolismo das lipoproteínas, destacam-se aqueles que codificam as apolipoproteínas, classificadas como uma família complexa de polipeptídeos que determinam o destino metabólico dos lipídios plasmáticos e a sua captação pelos tecidos.[32]

Gene da apolipoproteína E e risco cardiovascular

Com relação ao papel das apolipoproteínas na magnitude do risco cardiovascular, destaca-se a apolipoproteína E (APOE), uma glicoproteína do soro que se encontra associada aos quilomícrons circulantes, aos quilomícrons remanescentes e às lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL). Tem papel importante no metabolismo lipídico, pois favorece a captação de lipoproteínas contendo triacilgliceróis, participa do transporte reverso de colesterol e pode influenciar o desenvolvimento de DCV.[33] De acordo com Sing e Davignon,[34] a contribuição da APOE para a variabilidade nas concentrações plasmáticas de colesterol é mais importante que a contribuição de qualquer outro gene envolvido com o metabolismo do colesterol já identificado.

O gene que codifica a APOE localiza-se no braço longo do cromossomo 19, tem quatro éxons e três íntrons e, após os processos de transcrição e tradução, dá origem a um polipeptídeo com 317 resíduos de aminoácidos. Duas mutações pontuais no éxon 4 causam uma alteração que se diferencia pelo conteúdo de cisteína e arginina nos códons 112 e 158, respectivamente, resultando em três alelos principais: ε2 (contém cisteína em ambas as posições); ε3 (contém cisteína na posição 112 e arginina na 158); e ε4 (possui arginina em ambas as posições) (Figura 4.4). Esses alelos dão origem a seis possibilidades de genótipos: E2/E2; E3/E3; E4/E4; E3/E2; E4/E2 e E4/E3.[35]

A prevalência do polimorfismo no gene da APOE é bastante variável, até mesmo entre indivíduos de um mesmo grupo étnico. Todavia, o alelo ε3 é o mais frequente nas populações investigadas, seguido pelo ε4. Já o alelo ε2 é o menos prevalente, não tendo sido detectado em algumas populações.[36]

Com relação aos efeitos sobre o risco cardiovascular, estima-se que 60% das variações na concentração sérica de colesterol sofrem influência de um determinante genético e que 14% delas são definidas por polimorfismos no gene da APOE.[35,37]

As isoformas da ApoE interagem de formas diferentes com receptores específicos de lipoproteínas, alterando as concentrações circulantes de colesterol. Na presença do alelo ε2 há menor eficiência na produção e na transferência de VLDL e de quilomícrons do plasma sanguíneo para o fígado, o que é determinado por propriedades de ligação. Contrariamente, a presença dos alelos ε3 e ε4 torna esse processo muito mais eficiente. Enquanto a APOE3 e a APOE4 se ligam aos receptores de lipoproteínas com afinidade aproximadamente igual, a capacidade de ligação da APOE2 é inferior a 2% quando comparada às outras duas isoformas. Dessa maneira, carreadores do alelo ε2 apresentam menor velocidade de metabolização dos lipídios alimentares. As diferenças na absorção pós-prandial de lipoproteínas resultam em alterações na regulação hepática dos receptores das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), o que contribui para as diferenças fenotípicas nas concentrações séricas de colesterol total e de LDL.[36]

Para explicar os efeitos da variação genética na APOE, Mamotte et al.[39] compararam a capacidade da VLDL e da LDL de indivíduos com genótipo E4/E4 e E3/E3 em

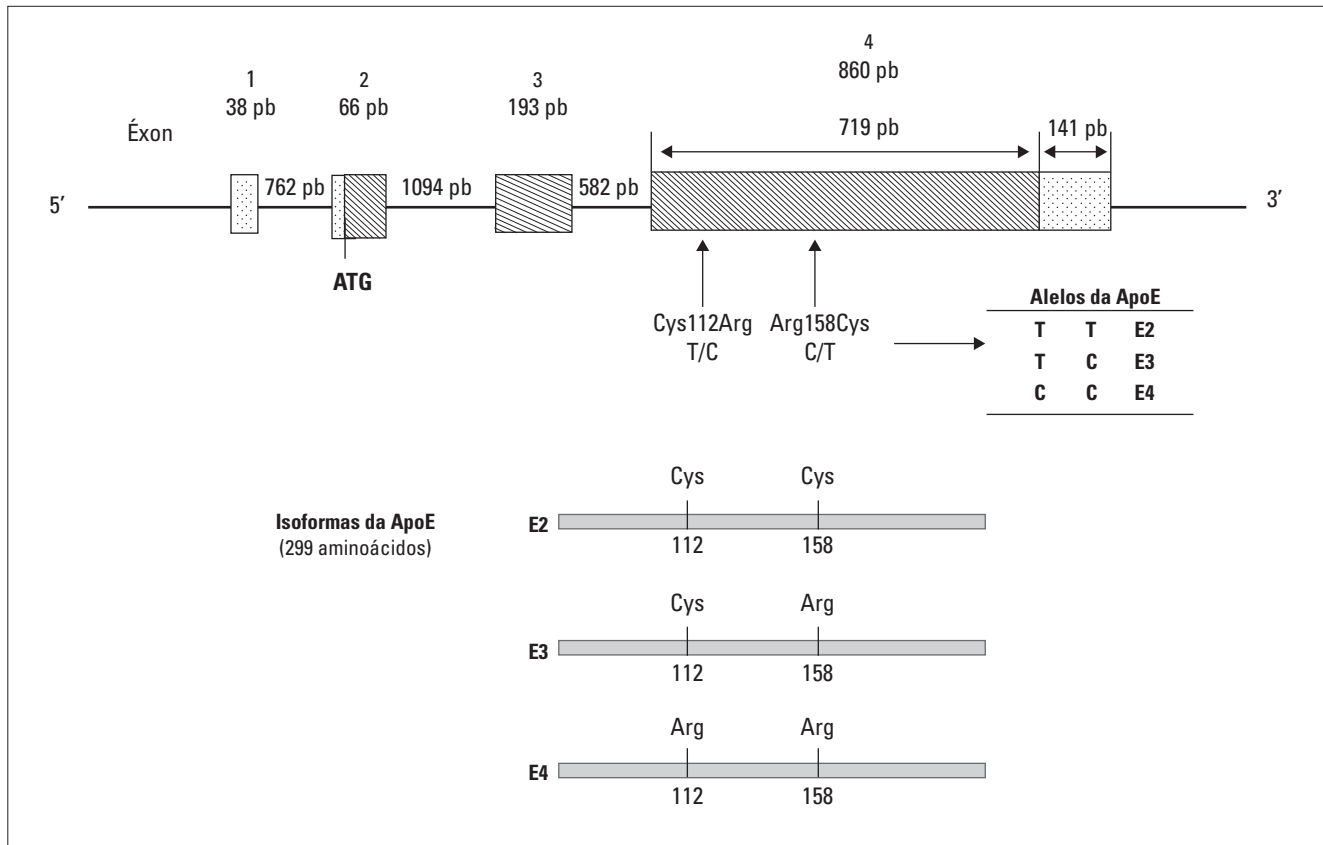



Figura 4.4 Gene humano da apolipoproteína E (19q13. 2; 3.59 kb), seus alelos e isoformas. Caixas pontilhadas: regiões não traduzidas de éxons; caixas com linhas em diagonal: regiões traduzidas de éxons. Arg: arginina; C: cistosina; Cys: cisteína; pb: pares de base; T: timina. **Fonte:** adaptada de Song et al.[38]

competir pela ligação com o receptor de LDL em cultura de fibroblastos e células HepG2. Nas células hepáticas, a VLDL de indivíduos E4/E4 foi mais eficiente que a de indivíduos E3/E3 na competição pelo receptor de LDL, o que não ocorreu em fibroblastos. Os resultados sugerem que a presença do alelo ε4 é associada com afinidade aumentada das partículas de VLDL e de LDL pelos receptores de LDL em hepatócitos e que isso pode explicar parcialmente a influência da isoforma E4 no metabolismo lipídico.

Uma metanálise de 82 estudos sobre concentrações de lipídios em indivíduos saudáveis e 121 estudos com indivíduos portadores de DCV demonstrou relação importante entre os genótipos da APOE, a concentração de LDL e o risco de desenvolvimento de DCV. Os resultados mostraram que, em razão de apresentarem concentrações séricas de colesterol total e LDL mais elevadas, indivíduos carreadores do alelo ε4 têm chances maiores de desenvolver DCV do que carreadores dos outros alelos.[37]

Considerando interações entre genes e nutrientes, estudo transversal com indivíduos europeus mostrou que concentrações séricas elevadas de LDL foram fortemente correlacionadas com o alto consumo de ácidos graxos saturados quando os participantes eram carreadores do alelo variante ε4. Tal correlação não foi observada nos indivíduos com os genótipos E2/E2, E2/E3 e E3/E3.[3,40]

Na literatura, há enfoque na considerável heterogeneidade observada na resposta individual à mesma intervenção alimentar, com particular destaque para a grande variação observada nas concentrações séricas de LDL de diferentes indivíduos em resposta à suplementação com óleo de peixe.[41] A despeito do efeito cardioprotetor dos ácidos graxos presentes no óleo de peixe (ácido eicosapentaenoico [EPA] e ácido docosaexaenoico [DHA]), aumento potencialmente deletério nas concentrações de LDL (entre 5 e 10%) tem sido relatado após o consumo de doses superiores a 2 g/dia de EPA em associação com DHA, com destaque para uma variação interindividual acentuada relacionada ao genótipo APOE4.[42,43]

Nesse sentido, Minihane et al.[44] verificaram aumento global de 7,1% nas concentrações séricas de LDL em indivíduos com fenótipo aterogênico de lipoproteínas que participaram de ensaio clínico *crossover* controlado por placebo, no qual consumiram 3 g de EPA+DHA ao dia, durante seis

semanas. O genótipo da APOE teve grande impacto nessa resposta, uma vez que tal aumento global nas concentrações de LDL ocorreu em razão de um aumento de 16% observado em indivíduos que carreavam o alelo ε4. Esses indivíduos também apresentaram reduções nas concentrações de lipoproteína de alta densidade (HDL) e aumento nas concentrações de colesterol total após a suplementação. Por outro lado, todos os indivíduos, independentemente do genótipo, apresentaram melhoras significativas no perfil de trigliceridemia. Entretanto, os autores sugerem que esse benefício pode ser contrabalanceado pelas alterações pró-aterogênicas observadas no perfil do colesterol.

Em outro estudo, homens normolipidêmicos, separados por genótipo (E3/E3 e E3/E4), foram suplementados com óleo rico em EPA (3,3 g/dia) ou óleo rico em DHA (3,7 g/dia) em estudo *crossover* controlado por placebo. Observou-se redução significativa nas concentrações de triacilgliceróis (28% no grupo EPA e 19% no grupo DHA), independentemente do perfil de genótipo. Entretanto, no grupo tratado com óleo rico em DHA, indivíduos com o genótipo E3/E4 apresentaram aumento de 10% nas concentrações de LDL, sugerindo que esse subgrupo de indivíduos possa não se beneficiar dos efeitos cardioprotetores do DHA.[45]

Apesar de os dados disponíveis na literatura destacarem o efeito potencial do genótipo na modulação das respostas fisiológicas à ingestão aumentada de ácidos graxos poli-insaturados da série ômega 3, sua utilidade ainda é limitada, uma vez que as associações relatadas frequentemente não são investigadas em outras coortes e confirmadas em estudos independentes.[46]

Polimorfismos no gene do fator de necrose tumoral-alfa (TNF-alfa) e resposta inflamatória

O TNF-alfa é uma citocina pleiotrópica com papel central na resposta inflamatória e está envolvido na regulação da função imune, na diferenciação e proliferação celular, na apoptose e no metabolismo energético. É considerado uma citocina pró-inflamatória, uma vez que a ligação ao seu receptor de membrana desencadeia uma gama de efeitos biológicos intracelulares, dentre os quais grande parte é relacionada à ativação dos fatores de transcrição designados fator nuclear kappa B (NF-kB) e proteína ativadora-1 (AP-1) e resulta na transcrição de genes que codificam proteínas com ação pró-inflamatória.[47-49] Aliado a esse fato, o TNF-alfa ativa vias de sinalização intracelulares que provocam a inibição da via de sinalização da insulina, sendo, portanto, inversamente correlacionado com o aumento da sensibilidade à ação desse hormônio.[50]

A síntese de TNF-alfa a partir de cultura de células do sangue total de indivíduos saudáveis apresenta variações interindividuais significativas, o que possibilita identificar indivíduos com fenótipo designado "alto" ou "baixo" produtor de TNF-alfa.[51] Tal fato está relacionado, em parte, à capacidade de determinados SNP presentes no gene do TNF-alfa de influenciar a síntese dessa citocina.

Em humanos, o gene do TNF-alfa está localizado na região cromossômica 6p21.3, na região de classe III do complexo de histocompatibilidade principal.[52] Entre os SNP localizados na região promotora do gene do TNF-alfa, destacam-se: −1031T>C (rs1799964), −863C>A (rs1800630), −857C>A (rs1799724), −851C>T (rs1799724), −376G>A (rs1800750), −308G>A (rs1800629) e −238G>A (rs361525). A presença de alelos variantes na região promotora do gene do TNF-alfa pode influenciar a atividade transcricional dessa citocina, o que favorece o desenvolvimento de condições clínicas associadas com a síntese excessiva de TNF-alfa, como artrite reumatoide, doença inflamatória intestinal e resistência à insulina.[53] O polimorfismo –308G>A tem considerável destaque na literatura.

Li[54] constatou, a partir de metanálise envolvendo 2.244 participantes, relação significativa positiva entre o polimorfismo –308G>A e hipertensão essencial em chineses, com particular suscetibilidade observada para carreadores do alelo A. Além disso, pacientes com artrite reumatoide e que carreiam o alelo C em relação ao SNP –1031T>C apresentam maior concentração de partículas de LDL pequenas e densas e maior suscetibilidade à oxidação, o que caracteriza maior risco cardiovascular para esses indivíduos.[55]

Wilson et al.[56] identificaram que a presença do alelo A referente ao SNP –308G>A está associada com maior risco para doenças, principalmente infecciosas e autoimunes. Todavia, resultados referentes ao possível papel funcional desse polimorfismo são conflitantes.[57] Estudos envolvendo ensaios de determinação da atividade transcricional do TNF-alfa por meio do gene repórter da luciferase mostram diferenças significativas entre os alelos; o alelo –308A apresenta duas vezes mais atividade que o –308G. Entre os fatores que poderiam explicar essa variação nos resultados, destacam-se as diferenças em relação ao tipo celular utilizado na transfecção celular, ao tipo de estímulo (lipopolissacarídeo – LPS, forbol miristato acetato e TNF-alfa), ao comprimento da sequência do promotor utilizado e à ausência das regiões 3' não traduzidas do RNA mensageiro (3'UTR).[58-60]

Indivíduos saudáveis e carreadores do alelo A em relação ao SNP –308G>A apresentam aumento da concentração plasmática de biomarcadores inflamatórios, como a proteína C reativa em alguns,[61,62] mas não em

todos os estudos.[63] Essa associação está relacionada à idade, ao sexo e à etnia. Metanálise (31 estudos, em um total de 1.624 indivíduos) verificou que esse polimorfismo esteve associado com síndrome metabólica em indivíduos carreadores do alelo A, os quais também apresentavam maiores valores de pressão arterial sistólica e de insulinemia de jejum, sendo esse efeito dependente da idade e da etnia da população estudada.[64] Em relação ao risco cardiovascular, outra metanálise com 17.030 indivíduos (23 estudos) não verificou associação do polimorfismo com doença cardíaca isquêmica e infarto do miocárdio, com exceção de indivíduos asiáticos, uma vez que o alelo A parece ser protetivo para tais eventos cardiovasculares nessa população.[65]

Alguns estudos observaram que o SNP –308G>A pode influenciar a resposta individual em relação à suplementação de vitamina E e de óleo de peixe. Nesse contexto, Grimble et al.[66] relataram que a suplementação de 6 g de óleo de peixe por dia, durante um período de 12 semanas, em homens saudáveis, reduziu a síntese *in vitro* de TNF-alfa a partir de células mononucleares do sangue periférico estimuladas por LPS. Entretanto, esse evento só foi observado em células extraídas de indivíduos que apresentavam capacidade elevada de síntese de TNF-alfa, independentemente do genótipo relativo ao SNP –308G>A. Contudo, o efeito supressivo da suplementação de óleo de peixe sobre a produção de TNF-alfa foi maior entre os indivíduos que estavam no maior tercil de produção de TNF-alfa no momento pré-suplementação e que carreavam o alelo A.

Em um estudo randomizado, controlado, duplo-cego, homens e mulheres idosos receberam suplementação de vitamina E (182 mg de alfa-tocoferol) durante um ano.[67] A produção *ex-vivo* de interleucina (IL)-1 beta, de IL-6 e de TNF-alfa foi determinada em amostras de sangue total incubado com LPS por 24 horas. Apesar da ausência de efeito em relação ao tratamento para qualquer uma das citocinas, quando o genótipo foi avaliado, verificou-se que os indivíduos que carreavam o alelo A relativo ao SNP TNF-alfa –308G>A, quando suplementados com vitamina E, tinham menor produção de TNF-alfa em relação àqueles do grupo placebo que também carreavam o alelo A.

Existem algumas evidências de que o alelo –308A do gene do TNF-alfa possa influenciar a resposta esperada a determinada intervenção alimentar em indivíduos obesos. Nesse sentido, obesos não diabéticos foram aleatoriamente distribuídos em dois grupos com restrição calórica durante dois meses: dieta com baixo teor de lipídios (valor calórico total [VCT]: 1.500 kcal/dia, 52% de carboidratos, 20% de proteínas e 27% de lipídios); dieta com baixo teor de carboidratos (VCT: 1.507 kcal/dia, 38% de carboidratos, 26% de proteínas e 36% de lipídios). Os resultados desse estudo indicaram que indivíduos obesos carreadores do alelo A respondem diferentemente às intervenções supracitadas, uma vez que, contrariamente ao observado nos indivíduos com o genótipo GG, não houve melhora nas concentrações plasmáticas de glicose, insulina, triacilgliceróis, colesterol total e LDL, nem nos valores de pressão sanguínea ao final do protocolo experimental.[68]

Joffe et al.,[69] em estudo caso controle com 105 mulheres eutróficas (IMC ≤ 25 kg/m^2) e 118 obesas (IMC ≥ 30 kg/m^2) da África do Sul, verificaram que o SNP –308G>A mostrou interação com a ingestão de lipídios (% do VCT) na probabilidade para ocorrência de obesidade. As carreadoras do alelo variante A apresentaram menor risco de desenvolver obesidade com ingestão de 30% de lipídios totais em relação ao VCT; entretanto, esse efeito se mostrou dose-dependente, ou seja, ao atingir o consumo de lipídios de 40,6% em relação ao VCT, o risco para obesidade se igualou àquele do genótipo GG. Além disso, interações também foram encontradas entre o SNP avaliado e a ingestão do ácido graxo alfa-linolênico (ALA, % do VCT) sobre a razão colesterol total:HDL. Indivíduos GA+AA apresentaram redução nessa razão em função do aumento da ingestão de ALA. Além disso, constatou-se interação entre o SNP e a ingestão de ácidos graxos poli-insaturados (% do VCT) sobre a concentração de LDL, uma vez que indivíduos GA+AA apresentaram aumento da concentração plasmática de LDL em função do aumento do consumo de poli-insaturados.

Em ensaio clínico randomizado, duplo-cego e prospectivo, realizado com homens e mulheres espanhóis, com idade entre 20 a 75 anos, participantes do estudo Cardioprev, constatou-se que os indivíduos que carreavam o genótipo GG relativo ao SNP –308G>A apresentaram concentrações basais de triacilgliceróis e de proteína C reativa de alta sensibilidade maiores que os carreadores do alelo A. Entretanto, após 12 meses de intervenção com dieta mediterrânea, a diferença entre os genótipos não foi mais observada. O delta dos indivíduos GG foi significativamente maior, ou seja, eles foram mais responsivos em diminuir a concentração de triacilgliceróis e proteína C reativa de alta sensibilidade.[70]

ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO AMPLA DO GENOMA (GWAS)

Os estudos de nutrigenética com abordagem baseada em genes candidatos avaliam a influência de poucos SNP sobre o risco de desenvolvimento de doenças. Por outro lado, os GWAS referem-se às mensurações e análises de centenas a milhares de variações na sequência de DNA ao longo de todo o genoma humano, com o objetivo de identificar fatores de risco genético para doenças comuns

na população e de utilizar tais fatores de risco na identificação das bases biológicas da suscetibilidade às doenças para desenvolvimento de estratégias de prevenção e tratamento.[71] Tais estudos são particularmente importantes na determinação de variações genéticas que contribuem para doenças complexas e comuns, como asma, câncer, diabetes, doenças cardíacas e doenças mentais.[72]

Para a realização de um GWAS, são utilizados dois grupos de participantes: um grupo de indivíduos que apresentam a doença em estudo e outro grupo com características gerais semelhantes, porém sem a doença em questão. O DNA desses indivíduos é coletado a partir de amostras de sangue ou saliva e analisado em *chips* que podem avaliar centenas ou até mesmo milhares de SNP. Quando determinadas variações genéticas são encontradas com frequência significativamente superior nos indivíduos que apresentam a doença em relação àqueles do grupo controle, considera-se que a variação é associada à doença. Essas variações que são associadas à condição em análise podem ser indicadores potenciais da região do genoma relacionada à causa da doença (Figura 4.5).[72]

Um exemplo importante de GWAS refere-se aos resultados apresentados por Frayling et al.,[73] que compararam 490.032 SNP de 1.924 indivíduos ingleses com diabete melito tipo 2 e de 2.938 controles, na busca por variações genéticas relacionadas a essa doença. Polimorfismos no gene *FTO* (*fat mass and obesity associated*) foram fortemente associados com o diabete tipo 2, com destaque para o rs9939609 (46-23525T>A, no íntron 1); tal associação foi replicada em outros 3.757 pacientes com diabete e 5.346 controles. De forma interessante, os alelos de risco para diabete foram fortemente associados com o aumento do IMC, sugerindo que a relação dos SNP com diabete é mediada por alterações nesse marcador antropométrico. A associação do SNP rs9939609 com mudanças no IMC e com o risco de sobrepeso e obesidade foi avaliada em mais 14.424 adultos e em 10.172 crianças de nacionalidade europeia. Nos adultos, a presença do alelo variante A foi positivamente correlacionada com maior risco de sobrepeso e de obesidade em indivíduos de todas as faixas etárias e de ambos os sexos. A extensão da variação no IMC explicada pelo SNP FTO rs9939609 foi de aproximadamente 1% e os riscos de obesidade e sobrepeso atribuídos à presença do alelo variante foram de 20,4% e 12,7%, respectivamente. Nas crianças, o SNP também foi associa-

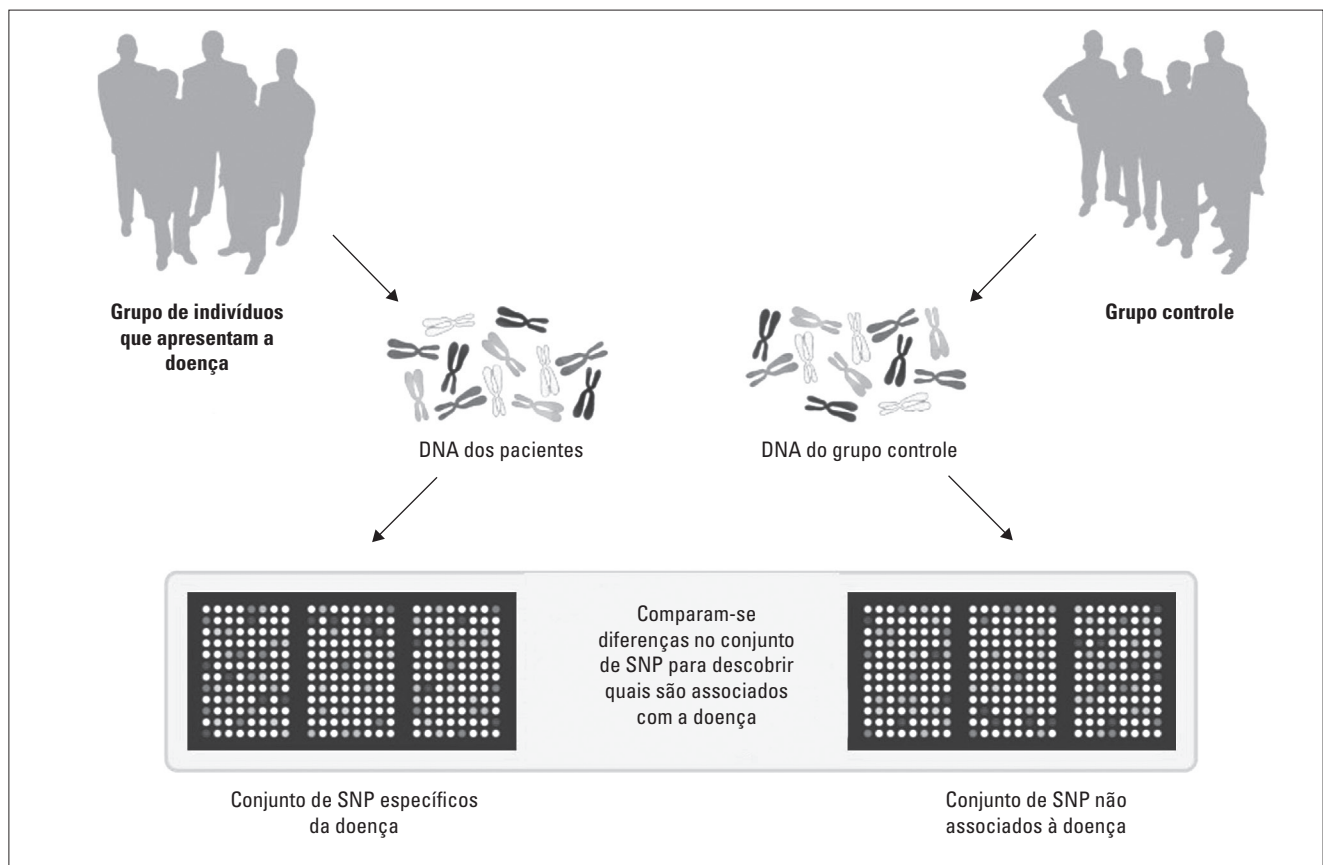



Figura 4.5 Representação esquemática de um estudo de associação ampla do genoma (GWAS). **Fonte:** https://www.mpg.de/10680/Modern_psychiatry.

do com alterações no IMC e maior risco de obesidade a partir dos sete anos de idade, com as alterações persistindo na puberdade e vida adulta. Em todas as populações analisadas também foi observada associação do alelo de risco A com maior peso, circunferência da cintura e massa adiposa subcutânea.

Dessa forma, GWAS contribuem para a seleção de polimorfismos que podem ser utilizados em estudos de replicação para confirmar a sua associação com o desenvolvimento de determinadas doenças. A partir dessa confirmação, podem ser realizados estudos de intervenção com vistas à promoção da saúde e à redução do risco do desenvolvimento de DCNT.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os projetos Genoma Humano, HapMap e 1.000 Genomas trazem resultados que fundamentam o avanço de estudos em nutrigenética. O entendimento das bases genéticas da variabilidade individual na resposta à ingestão de nutrientes e de CBA fornece medida mais acurada da exposição de tecidos alvo a tais compostos e seus metabólitos e permite melhor compreensão dos seus efeitos na saúde e no risco de desenvolvimento de doenças. Espera-se que a identificação de interações relevantes entre alimentação e genes não beneficie apenas indivíduos que buscam orientações nutricionais personalizadas, mas também que ajude a refinar as recomendações de saúde pública, por meio de evidências científicas sólidas relacionando compostos alimentares específicos com diversos desfechos de saúde.[24]

REFERÊNCIAS

1. Bouchard C, Ordovas JM. Fundamentals of nutrigenetics and nutrigenomics. Prog Mol Biol Transl Sci. 2012;108:1-15.
2. Camp KM, Trujillo E. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: nutritional genomics. J Acad Nutr Diet. 2014;114(2):299-312.
3. Mitchell JJ, Trakadis YJ, Scriver CR. Phenylalanine hydroxylase deficiency. Genet Med. 2011;13(8):697-707.
4. Simopoulos AP. Nutrigenetics/Nutrigenomics. Annu Rev Public Health. 2010;31:53-68.
5. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. Nature. 1953;171(4356):737-38.
6. [NHGRI] National Human Genome Research Institute. An overview of the Human Genome Project: a brief history of the Human Genome Project (2012). Disponível em: http://www.genome.gov/12011239. Revisado em: 8 nov. 2012. Acesso em: 14 jul. 2015.
7. Fitzgerald-Hayes M, Reichsman F. DNA and biotechnology. San Diego: Elsevier; 2010.
8. Myers EW, Sutton GG, Smith HO, Adams MD, Venter JC. On the sequencing and assembly of the human genome. Proc Natl Acad Sci USA. 2002;99(7):4145-46.
9. Lander ES et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature. 2001;409(6822):860-921.
10. Venter JC et al. The sequence of the human genome. Science. 2001;291(5507):1304-51.
11. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. Nature. 2004;431(7011):931-45.
12. International HapMap Consortium. The International HapMap Project. Nature. 2003;426(6968):789-96.
13. 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. Nature. 2012;491(7422):56-65.
14. 1.000 Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Altshuler D, Auton A, Brooks LD, Durbin RM et al. A map of human genome variation from population-scale sequencing. Nature. 2010;467(7319):1061-73.
15. Tefferi A. Genomics basics: DNA structure, gene expression, cloning, genetic mapping, and molecular tests. Semin Cardiothorac Vasc Anesth. 2006;10(4):282-90.
16. Kauwell GP. Emerging concepts in nutrigenomics: a preview of what is to come. Nutr Clin Pract. 2005;20(1):75-87.
17. Nelson DL, Cox MM. Lehninger principles of biochemistry. 4.ed. HW Freeman: New York; 2005.
18. Lairon D, Defoort C, Martin JC, Amiot-Carlin MJ, Gastaldi M, Planells R. Nutrigenetics: links between genetic background and response to Mediterranean-type diets. Public Health Nutr. 2009;12(9A):1601-06.
19. [NHGRI] National Human Genome Research Institute. Whole Genome Association Studies (2011). Disponível em: http://www.genome.gov/17516714. Revisado em: 15 jul. 2011. Acesso em: 17 jul. 2015.
20. Levy S, Sutton G, Ng PC, Feuk L, Halpern AL, Walenz BP et al. The diploid genome sequence of an individual human. PLoS Biol. 2007;5(10):e254.
21. Horst MA, Cominetti C. Genômica nutricional. In: Cozzolino SMF, Cominetti C. Bases bioquímicas e fisiológicas da nutrição: nas diferentes fases da vida, na saúde e na doença. Barueri: Manole; 2013.
22. Gillies PJ. Nutrigenomics: the Rubicon of molecular nutrition. J Am Diet Assoc. 2003;103(12 Suppl 2):S50-5.
23. Patnala R, Clements J, Batra J. Candidate gene association studies: a comprehensive guide to useful in silico tools. BMC Genet. 2013;14:39.
24. Fenech M, et al. Nutrigenetics and nutrigenomics: Viewpointson the current status and applications in nutrition research and practice. J. Nutrigenet. Nutrigenomics. 2011;4(2):69-89.
25. Cornelis MC, El-Sohemy A. Coffee, caffeine, and coronary heart disease. Curr Opin Lipidol. 2007;18:13-19.
26. Chen NC, Yang F, Capecci LM, Gu Z, Schafer AI, Durante W, etc. Regulation of homocysteine metabolism and methylation in human and mouse tissues. Faseb Journal, Bethesda, 2010;24(8):2804-
27. Papa A, De-Stefano V, Danese S, Chiusolo P, Persichilli S, Casorelli I, et al. Hyperhomocysteinemia and Prevalence of Polymorphisms of Homocysteine Metabolism – Related Enzymes in Patients with Inflammatory Bowel Disease. American Journal of Gastroenterology, New York, 2001;96(9):2677-82.
28. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, etc. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Nature Genetics, New York, 1995;10(1):11-113.

29. Liew SC, Gupta ED. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated diseases. Eur J Med Genet. 2015;58(1):1-10.
30. Blom HJ, Smulders Y. Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. Journal of Inherited Metabolic Disease, Lancaster, 2011;34(1):75-81.
31. Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascu-lardisease: evidence on causality from a meta-analysis. British Medical Journal, London, 2002;325(7374):1-7.
32. Ordovas JM, Corella D. Genes, diet and plasma lipids: the evidence from observational studies. World Rev Nutr Diet. 2004;93:41-76.
33. Zende PD, Bankar MP, Kamble PS, Momin AA. Apolipoprotein E gene polymorphism and its effect on plasma lipids in arteriosclerosis. J Clin Diagn Res. 2013;7(10):2149-52.
34. Sing CF, Davignon J. Role of the apolipoprotein E polymorphism in determining normal plasma lipid and lipoprotein variation. Am J Hum Genet. 1985;37(2):268-85.
35. Anoop S, Misra A, Meena K, Luthra K. Apolipoprotein E polymorphism in cerebrovascular & coronary heart diseases. Indian J Med Res. 2010;132:363-78.
36. Eichner JE, Dunn ST, Perveen G, Thompson DM, Stewart KE, Stroehla BC. Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: a HuGE review. Am J Epidemiol. 2002;155(6):487-95.
37. Garcia-Rios A, Perez-Martinez P, Delgado-Lista J, Lopez-Miranda J, Perez-Jimenez F. Nutrigenetics of the lipoprotein metabolism. Mol Nutr Food Res. 2012;56(1):171-83.
38. Song Y, Stampfer MJ, Liu S. Meta-analysis: apolipoprotein E genotypes and risk for coronary heart disease. Ann Intern Med. 2004;141(2):137-47.
39. Mamote CD, Sturm M, Foo JI, Van Bockxmeer FM, Taylor R. Comparison of the LDL-receptor binding of VLDL and LDL from apoE4 and apoE3 homozygotes. Am J Physiol, Endocrinol Metab, 1999;276(pt.1):553-7.
40. Loktionov A, Scollen S, McKeown N, Bingham SA. Gene-nutrient interactions: dietary behaviour associated with high coronary heart disease risk particularly affects serum LDL cholesterol in apolipoprotein E epsilon4-carrying free-living individuals. Br J Nutr. 2000;84(6):885-90.
41. Lovegrove JA, Gitau R. Nutrigenetics and CVD: what does the future hold? Proc Nutr Soc. 2008;67(2):206-13.
42. Lovegrove JA, Lovegrove SS, Lesauvage SV, Brady LM, Saini N, Minihane AM et al. Moderate fish-oil supplementation reverses low-platelet, long-chain n-3 polyunsaturated fatty acid status and reduces plasma triacylglycerol concentrations in British Indo-Asians. Am J Clin Nutr. 2004;79(6):974-82.
43. Brady LM, Lovegrove SS, Lesauvage SV, Gower BA, Minihane AM, Williams CM et al. Increased n-6 polyunsaturated fatty acids do not attenuate the effects of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids on insulin sensitivity or triacylglycerol reduction in Indian Asians. Am J Clin Nutr. 2004;79(6):983-91.
44. Minihane AM, Khan S, Leigh-Firbank EC, Talmud P, Wright JW, Murphy MC, et al. ApoE polymorphism and fish oil supplementation in subjects with an atherogenic lipoprotein phenotype. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, Dallas, 2000;20(8):1990-7.
45. Olano-Martin E, et al. Contribution of apolipoprotein E genotype and docosahexaenoic acid to the LDL-cholesterol response to fish oil. Atherosclerosis, 2010;209(1):4-10.
46. Madden J, et al. The impact of common gene variants on the response of biomarkers of cardiovascular disease (CVD) risk to increased fish oil fatty acids intakes. Annual Review of Nutrition, 2011;31:203-34.
47. Lumeng CN, Deyoung SM, Saltiel AR. Macrophages block insulin action in adipocytes by altering expression of signaling and glucose transport proteins. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2007;292(1):E166-E174.
48. Steinberg GR. Inflammation in obesity is the common link between defects in fatty acid metabolism and insulin resistance. Cell Cycle. 2007;6(8):888-94.
49. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-α: direct role in obesity-linked insulin resistance. Science. 1993;259(5091):87-91.
50. Cawthorn WP, Sethi JK. TNF-α and adipocyte biology. FEBS Letters. 2008;582(1):117-31.
51. Louis E, Franchimont D, Piron A. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-α production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. Clin Exp Immunol. 1998;113(3):401-06.
52. Hajeer AH, Hutchinson IV. TNF-α gene polymorphism: clinical and biological implications. Microsc Res Tech. 2000;50(3):216-28.
53. Elahi MM, Asotra K, Matata BM, Mastana SS. Tumor necrosis factor alpha−308 gene locus promoter polymorphism: an analysis of association with health and disease. Biochim Biophys Acta. 2009;1792(3):163-72.
54. Li Y. Tumor necrosis factor-alpha G308A gene polymorphism and essential hypertension: a meta-analysis involving 2244 participants. Plos One. 2012;7(4):e35408.
55. Vallé JC, Paredes S, Girona J, Uliaque K, Ribalta J, Hurt-Camejo E et al. Tumor necrosis factor-α –1031 T/C polymorphism is associated with smaller and more proatherogenic low density lipoprotein particles in patients with rheumatoid arthritis. J Rheumatol. 2008;35(9):1697-703.
56. Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AIF, Duff GW. Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNFα) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. Hum Mol Genet. 1992;1(5):353.
57. Smith AJP, Humphries SE. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. Cytokine Growth Factor Rev. 2009;20(1):43-59.
58. Kroeger KM, Steer JH, Joyce DA, Abraham LJ. Effects of stimulus and cell type on the expression of the –308 tumour necrosis factor promoter polymorphism. Cytokine. 2000;12(2):110-19.
59. Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The –308 tumor necrosis factor-α promoter polymorphism effects transcription. Mol Immunol. 1997;34(5):391-99.
60. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor α promoter on transcriptional activation. Proc Natl Acad Sci USA. 1997;94(7):3195-99.
61. Lakka HM, Lakka TA, Rankinen T, Rice T, Rao DC, Leon AS et al. The TNF-α G-308A polymorphism is associated with C-reactive protein levels: The Heritage Family Study. Vascul Pharmacol. 2006;44(5):377-83.
62. Araújo F, Pereira AC, Mota GF, Latorre MR, Krieger JE, Mansur AJ. The influence of tumor necrosis factor –308 and C-reactive protein G1059C gene variants on serum concentration of C-reactive protein: evidence for an age-dependent association. Clin Chim Acta. 2004;349(1-2):129-34.
63. Gander ML, Fischer JE, Maly FE, Kanel R. Effect of the G-308A polymorphism of the tumor necrosis factor (TNF)-α gene promoter site on plasma levels of TNF-α and C-reactive protein in smokers: a cross-sectional study. BMC Cardiovasc Disord. 2004;4:17.

64. Sookoian SC, Gonzalez C, Pirola CJ. Meta-analysis on the G-308A tumor necrosis factor α gene variant and phenotypes associated with the metabolic syndrome. Obes Res. 2005;13(12):2122-31.
65. Pereira TV, Rudnicki M, Franco RF, Pereira AC, Krieger JE. Effect of the G-308A polymorphism of the tumor necrosis factor α gene on the risk of ischemic heart disease and ischemic stroke: a meta-analysis. Am Heart J. 2007;153(5):821-30.
66. Grimble RF, Howell WM, O'Reilly G. The ability of fish oil to suppress tumor necrosis factor α production by peripheral blood mononuclear cells in healthy men is associated with polymorphisms in genes that influence tumor necrosis factor α production. Am J Clin Nutr. 2002;76(2):454-59.
67. Belisle SE, Leka LS, Delgado-Lista J, Jacques PF, Ordovas JM, Meydani SN. Polymorphisms at cytokine genes may determine the effect of vitamin E on cytokine production in the elderly. J Nutr. 2009;139(10):1855-60.
68. Luis DA, Aller R, Izaola O, Sagrado MG, Conde R. Influence of G308A promoter variant of tumor necrosis factor-α gene on insulin resistance and weight loss secondary to two hypocaloric diets: a randomized clinical trial. Arch Med Res. 2009;40(1):36-41.
69. Joffe YT, van der Merwe L, Carstens M, Collins M, Jennings C, Levitt NS et al. Tumor necrosis factor-alpha gene –308 G/A polymorphism modulates the relationship between dietary fat intake, serum lipids, and obesity risk in black South African women. J Nutr. 2010;140(5):901-07.
70. Gomez-Delgado F, et al. Polymorphism at the TNF-alpha gene interacts with Mediterranean diet to influence triglyceride metabolism and inflammation status in metabolic syndrome patients: From the CORDIOPREV clinical trial. Mol Nutr Food Res. 2014;58(7):1519-27.
71. Bush WS, Moore JH. Chapter 11: Genome-wide association studies. PLoS Comput Biol. 2012;8(12):e1002822.
72. [NHGRI] National Human Genome Research Institute. Genome-wide association studies (2015). Disponível em: http://www.genome.gov/20019523. Revisado em: 31 mar. 2015. Acesso em: 21 jul. 2015.
73. Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM et al. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. Science. 2007;316(5826):889-94.

Fundamentos de epigenética e nutrição 5

Maria Aderuza Horst
Ana Carolina de Carvalho
Andre Luiz Vettore

INTRODUÇÃO

Todas as células de um organismo multicelular têm sequências idênticas de ácido desoxirribonucleico (DNA), portanto, o mesmo conteúdo de informação genética. Entretanto, essas células podem apresentar fenótipos bastante distintos. Além disso, a genética isoladamente não pode explicar a enorme diversidade de fenótipos encontrados em uma população e o fato de gêmeos monozigóticos ou animais clonados, que possuem sequências de DNA idênticas, poderem apresentar fenótipos distintos e predisposição diferente a determinadas doenças.[1,2] O conceito de epigenética oferece uma possível explicação para parte desses fenômenos.

Ao elucidar a estrutura química da molécula de DNA e propor o mecanismo pelo qual ocorre a replicação dessa molécula, Watson e Crick[3] mostraram como a informação genética flui nos múltiplos ciclos de divisão celular. Estudos recentes têm desvendado mecanismos de transmissão da informação contida fora da molécula de DNA (informação "não genética"), a chamada herança epigenética.

O perfil epigenético do genoma varia de forma dinâmica, de tecido para tecido, diferentemente do que ocorre com a sequência estática do DNA.[4] Alterações nos sinais epigenéticos envolvem grande número de enzimas atuando em conjunto para permitir que a informação epigenética resulte em modificações reversíveis no padrão de expressão gênica sem que haja alteração da sequência do DNA. Os principais eventos epigenéticos incluem a atividade de ácido ribonucleico (RNA) não codificante, a metilação do DNA e as modificações pós-transcricionais (acetilação, metilação, fosforilação, entre outras) que ocorrem nas proteínas designadas histonas. Esses eventos epigenéticos são responsáveis pela formação, manutenção e reversão de padrões de transcrição gênica e são fundamentais para a capacidade da célula de "lembrar" de eventos passados, como alterações no ambiente externo ou sinais de desenvolvimento.[5]

As marcas epigenéticas podem ser modificadas em resposta a estímulos específicos recebidos durante um curto período, mas com efeitos de longa duração ao longo da vida do organismo e, possivelmente, nas gerações seguintes.[6] Muitas dessas marcas epigenéticas, obtidas ainda na fase embrionária, são dinamicamente reguladas por meio da remodelação epigenética ao longo de toda a vida adulta do organismo. Sabidamente, o desenvolvimento de padrões epigenéticos é influenciado por fatores ambientais ainda na fase embrionária. Já foi comprovado que, em diferentes espécies, fatores ambientais, como temperatura ou presença de predadores, afetam o fenótipo da prole. Em humanos e ratos, a fisiologia do feto é influenciada pelo estado nutricional e emocional (especialmente o nível de estresse) da mãe.[7,8] Tal plasticidade fenotípica decorrente de alterações epigenéticas durante o desenvolvimento embrionário é de extrema importância, pois pode resultar em preparação da prole para o tipo de ambiente no qual ela terá de sobreviver.[9] Evidências recentes têm sugerido que nutrientes como ácido fólico, vitamina E, selênio e compostos bioativos de alimentos (CBA) – como isotiocianatos e flavonoides – desempenham papel protetor em relação a algumas doenças, sendo este mediado, em parte, por mecanismos epigenéticos.[10]

Por outro lado, potenciais efeitos decorrentes da regulação epigenética aberrante podem desempenhar papel relevante na etiologia ou patogênese de doenças metabólicas, respiratórias, neurodegenerativas, imunológicas, cardiovasculares e psiquiátricas, bem como no autismo, na obesidade e no câncer.[11-13] Contudo, sinais epigenéticos apresentam grande plasticidade, podendo ser modu-

lados, e até mesmo revertidos, sob a influência de diversos fatores, como alimentação, medicamentos, produtos químicos, fatores físicos e psicossociais.[14] A epigenética está intimamente relacionada com os mecanismos de *imprinting* genômico e com a programação metabólica, que são abordados em detalhes no Capítulo 28. Este capítulo descreve os três mecanismos epigenéticos conhecidos (metilação do DNA, modificações pós-traducionais em histonas e microRNA [miRNA]), bem como a influência da alimentação, dos nutrientes e dos CBA na modulação de tais eventos.

DEFINIÇÃO E CONCEITOS

A adaptação às alterações ambientais e a especialização celular em organismos multicelulares dependem de uma orquestração afinada da transcrição do genoma. Desde a mais simples bactéria até o mais sofisticado e especializado neurônio desenvolveram mecanismos complexos para transmitir, durante a divisão celular, informações sobre estímulos recebidos. A manutenção da identidade celular em um organismo multicelular constitui um clássico exemplo desta "memória" celular hereditária, pois, a partir do mesmo genoma contido no zigoto, subconjuntos de células-filhas se engajam em programações distintas de expressão gênica, as quais determinam suas trajetórias de desenvolvimento, culminando na capacidade de desenvolver funções específicas (diferenciação celular). Além disso, apesar de muitas vezes o sinal de diferenciação ter ocorrido apenas durante o período embrionário, a identidade celular é mantida por toda a vida do organismo.[15] Portanto, manter a identidade celular envolve um padrão complexo de expressão gênica que deve ser fielmente transmitido para cada célula-filha. Esse conjunto de processos que garante a transmissão das informações que estão contidas acima e além (epi) da sequência de DNA (genética) é denominado *epigenética*.[16]

O termo epigenética foi usado pela primeira vez em 1942, por Conrad H. Waddington[17] para definir "o ramo da biologia que estuda as interações causais entre os genes e seus produtos e que levam ao surgimento de determinado fenótipo". Nessa época, a natureza física dos genes e seu papel na hereditariedade ainda não eram conhecidos, tendo ele usado esse termo como um modelo conceitual para explicar como o DNA podia interagir com o ambiente para produzir um fenótipo. Mais de uma década depois, em 1958, David L. Nanney[18] definiu *sistemas epigenéticos* como "mecanismos auxiliares envolvidos na determinação de quais especificidades (genes) devem ser expressas em uma célula em particular". Ao revisar essa definição em 1987, Robin Holliday[19] aplicou o termo *epigenética* a "situações em que as alterações no padrão de metilação do DNA resultam em mudanças na atividade gênica". Com a ideia de que características epigenéticas eram herdadas como sinais regulatórios em adição às informações genéticas, o termo *epigenética* passou a se referir ao "conjunto de alterações nas funções gênicas que não podiam ser explicadas por alterações na sequência de DNA e são herdadas durante os processos de mitose e/ou meiose".[20] Em seguida, a descoberta do papel regulador das modificações pós-traducionais ocorridas nas histonas e seus efeitos na regulação da transcrição gênica promoveu o uso mais flexível do termo *epigenética*, passando este a significar toda e qualquer assinatura molecular encontrada nos cromossomos e amplamente definida como "adaptações estruturais das regiões cromossômicas a fim de registrar, sinalizar ou perpetuar estados de atividade alterada".[21] Na mesma época, foi proposta uma definição mais restritiva que considerava *epigenética* o conjunto de "fenótipos estáveis e hereditários resultantes de alterações nos cromossomos sem que ocorram modificações na sequência do DNA".[22]

Em 2010, foi proposto que, ao contrário dos alelos genéticos, os epialelos não diferem em sua sequência de DNA e a informação epigenética resida em assinaturas moleculares capazes de se autopropagar e que fornecem memória de estímulos anteriormente vivenciados, sem mudanças irreversíveis na informação genética.[23] Apesar de décadas de debate e investigação, a definição de *epigenética* permanece controversa e ambígua. De forma simples e abrangente, o termo pode ser empregado para descrever alterações reversíveis que ocorrem no perfil de expressão gênica, sem que haja alteração da sequência de DNA, e que são herdadas mesmo na ausência do sinal ou evento que as iniciou.[22,24]

Os eventos epigenéticos podem atuar de forma *trans*. Nesta categoria se encontram os fatores de transcrição, que se ligam às moléculas de DNA e regulam a expressão gênica, e os miRNA, que regulam a tradução dos RNA mensageiros (RNAm). Por outro lado, as marcas epigenéticas *cis* estão fisicamente associadas ao cromossomo ou à região do DNA em que atuam. Como exemplos dessa categoria podem ser citadas as modificações covalentes na cromatina, como a metilação do DNA e as alterações nas proteínas histonas. As histonas podem transportar informações em sua sequência primária (variantes nos genes que codificam histonas), em modificações pós-traducionais, muitas vezes presentes em suas caudas N-terminais, ou, ainda, em seu posicionamento relativo à sequência de DNA.[25-27]

A informação epigenética fornece um tipo de "memória" que é necessária para a manutenção da função do genoma, influenciando os padrões de expressão gênica diferencial de determinada célula (compreendendo, por

exemplo, a manutenção da identidade celular após a diferenciação, mecanismos de compensação de dosagem envolvidos na inativação de um dos cromossomos X nas fêmeas de mamíferos e *imprint* genômico) e a propagação de características estruturais essenciais, como os telômeros e centrômeros, que são necessários para a viabilidade e proliferação celular.[28,29] A metilação de sequências genômicas repetitivas provavelmente impede a instabilidade cromossômica, as translocações e a disrupção de genes geradas pela reativação de elementos transponíveis (*transposons* – sequências de nucleotídeos que podem mudar de posição no DNA e ocasionar mutações).[30] Nas células em que esse efeito estabilizador desempenhado pela metilação no DNA não estiver presente, em razão de alterações nas enzimas responsáveis por adicionar radicais metil (CH_3) à molécula de DNA (DNA metiltransferases – DNMT), inúmeras aberrações nucleares estão presentes.[31,32]

ORGANIZAÇÃO DA CROMATINA

De forma geral, o termo cromatina se refere ao complexo formado por DNA e proteínas, localizado no núcleo de células eucarióticas. O 1,8 metro linear da molécula de DNA presente em cada célula humana é organizado dentro de uma estrutura tridimensional e compactado dentro do núcleo celular por meio da associação com proteínas de empacotamento do DNA chamadas de histonas. Esses complexos DNA-histonas são os principais componentes da cromatina. A unidade básica da cromatina é o nucleossomo, cuja estrutura é constituída por 147 pares de bases de DNA, enovelado ao redor de um octâmero proteico, contendo duas moléculas de cada uma das quatro principais histonas (H2A, H2B, H3, H4). Os nucleossomos são interligados pela histona H1, uma proteína de ligação encontrada fora do octâmero de histonas e que se liga ao DNA nos pontos de entrada e de saída do nucleossomo (Figura 5.1).[33]

Existem dois tipos de organização da cromatina que são definidos conforme o nível de compactação dos nucleossomos: a eucromatina e a heterocromatina. A eucromatina é pouco condensada e, em razão do aumento da acessibilidade ao DNA na estrutura do nucleossomo, geralmente representa regiões transcricionalmente ativas. Em contraste, a heterocromatina é densamente enovelada, podendo ser classificada em (1) constitutiva ou permanentemente silenciada (que jamais é descompactada) e (2) facultativa, que representa a heterocromatina silen-

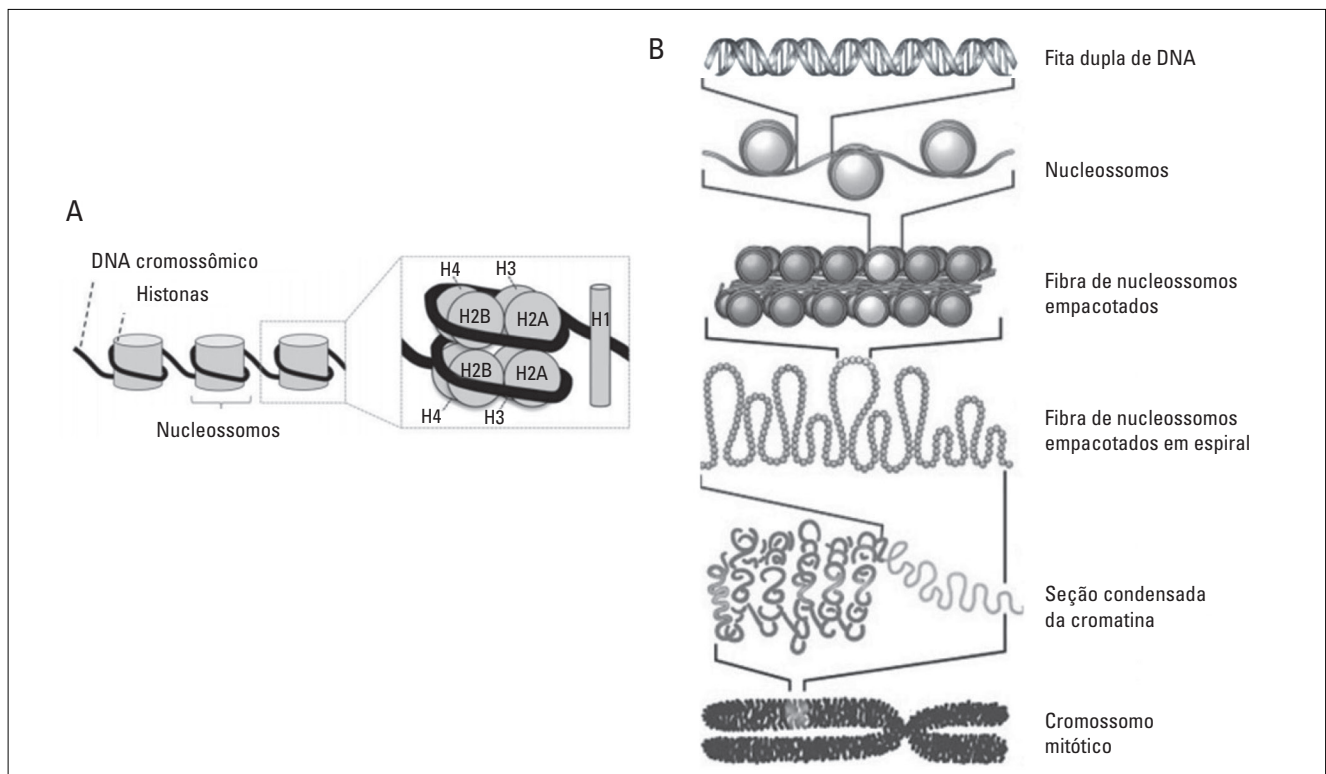



Figura 5.1 Estrutura do nucleossomo. A: o nucleossomo é constituído por duas voltas completas de DNA enroladas ao redor de um complexo formado de quatro pares de histonas; B: modelo de empacotamento da cromatina. Este desenho esquemático apresenta algumas das várias ordens de empacotamento da cromatina que dão origem ao cromossomo mitótico altamente condensado. **Fonte:** adaptada de Alberts et al.[33]

ciada temporariamente e que pode tornar-se ativa em resposta a estímulos apropriados. Isso significa que, ao longo do ciclo de vida de uma célula, a conformação da cromatina é fluida, específica para cada tipo celular e propensa à restruturação em resposta a sinais ambientais ou fisiológicos.[34]

A conformação da cromatina é controlada principalmente por sinais epigenéticos, resultantes de modificações químicas que ocorrem na molécula de DNA e nas proteínas que estão intimamente associadas a ela, ou seja, nas histonas. A adição e remoção desses sinais epigenéticos é um processo dinâmico e altamente regulado que pode alterar a estrutura da cromatina, influenciando as interações dentro e entre os nucleossomos. Até o presente momento, já foram descritas quatro modificações epigenéticas distintas que podem ocorrer na molécula de DNA[35,36] e pelo menos 16 modificações que podem ocorrer em histonas.[27,37] Todas essas modificações encontram-se descritas na Tabela 5.1.

A principal modificação epigenética que ocorre em mamíferos é a adição de um radical metil (CH_3) no carbono 5 das bases nitrogenadas citosinas (C) localizadas a 5' das guaninas (G), ou seja, em uma sequência de dinucleotídeo CpG.[39] As modificações pós-traducionais que ocorrem em caudas N-terminal das histonas constituem um "código de histonas" que é resultado de um processo do qual participam enzimas que catalisam a adição dessas modificações (as "escritoras"), outras que participam da remoção dessas modificações (as "borrachas") ou, ainda, aquelas responsáveis pelo reconhecimento desses sinais e interpretação da informação regulatória contida neste "código" (as "leitoras"). As principais modificações pós-traducionais que ocorrem nas histonas são a metilação, a acetilação e a fosforilação.[40]

Uma questão interessante em relação à melilação do DNA e das histonas é entender como os padrões de metilação são estabelecidos, apagados, reconhecidos e herdados. Parece que metiltransferases, desmetilases e proteínas acessórias interagem para coordenar o estado de conformação da cromatina. Por exemplo, a metilação do DNA de mamíferos é altamente associada com o estado de metilação de histonas, especialmente à histona H3 nos resíduos de lisina 4 (H3K4) e 9 (H3K9), que têm efeitos opostos sobre a expressão gênica. Metilação em H3K4 aumenta a expressão gênica (cromatina transcricionalmente ativa) e metilação em H3K9 a diminui (cromatina transcricionalmente inativa). Assim, deve ocorrer simultaneamente a interação entre DNA desmetilado com H3K4 metilada para que a transcrição seja possível. Também é necessário um mecanismo finamente ajustado para garantir que H3K4 e H3K9 de um mesmo nucleossomo não sejam simultaneamente desmetiladas.[41]

Tabela 5.1 Modificações que ocorrem na cromatina

Modificações na cromatina	Nomenclatura	Função
	Modificações no DNA	
5-metilcitosina	5mC	Transcrição
5-hidroximetilcitosina	5hmC	Transcrição
5-formilcitosina	5fC	NC
5-carboxilcitosina	5caC	NC
	Modificações nas histonas	
Acetilação	K-ac	Transcrição, reparo, replicação e compactação da cromatina
Metilação (lisina)	K-me1, K-me2, K-me3	Transcrição e reparo
Metilação (arginina)	R-me1, R-me2s, R-me2a	Transcrição
Fosforilação (serina e treonina)	S-ph, T-ph	Transcrição, reparo e compactação da cromatina
Fosforilação (tirosina)	Y-ph	Transcrição e reparo
Ubiquitinação	K-ub	Transcrição e reparo
Sumoilação	K-su	Transcrição e reparo
ADP-ribosilação	E-ar	Transcrição e reparo
Desaminação	R/Cit	Transcrição e descompactação da cromatina
Isomerização da prolina	P-cis ↔ P-trans	Transcrição
Crotonização	K-cr	Transcrição
Propionilação	K-pr	NC
Butirilação	K-bu	NC
Formilação	K-fo	NC
Hidroxilação	Y-oh	NC
O-GlcN-acetilação (serina e treonina)	S-GlcNAc; T-GlcNAc	Transcrição

Modificações – me1: monometilação; me2: dimetilação; me3: trimetilação; me2s: dimetilação simétrica; me2a: dimetilação assimétrica; Cit: citrulina; ac: acetilação; ph: fosforilação; ub: ubiquitinação; su: sumoilação; ar: ribosilação; cr: crotonização; pr: propionilação; bu: butirilação; fo: formilação; oh: hidroxilação; nc: não conhecida. Letras correspondentes ao código internacional para designar aminoácidos – K: lisina; R: arginina; S: serina; T: treonina; Y: tirosina P: prolina. NC: não conhecida. **Fonte:** adaptada de Dawson e Kouzarides.[38]

Uma classe de RNA não codificante que desempenha papel relevante no controle das alterações epigenéticas e na conformação da cromatina é representada pelos miRNA.[42] Essa classe de pequenos RNA endógenos regula a expressão de genes por meio da repressão de sua tradução, representando importante categoria de moléculas reguladoras dos processos celulares. Os miRNA também atuam no controle da metilação do DNA e das modificações nas histonas, criando um mecanismo de *feedback* altamente controlado, uma vez que eventos epigenéticos também podem modular a expressão dos miRNA.[43,44] Mais detalhes da metilação do DNA, assim como das modificações das histonas e dos miRNA, são apresentados a seguir.

PRINCIPAIS MECANISMOS EPIGENÉTICOS

Aspectos gerais

Nos últimos dez anos, avanços em metodologias de mapeamento da cromatina e de avaliação da metilação do DNA permitiram uma verdadeira revolução no entendimento dos diferentes estados da cromatina e de seu papel na regulação da expressão gênica.[45-48] Assim como acontece com a informação genética, as marcas epigenéticas devem ser transmitidas para a geração seguinte para poderem ser qualificadas como informação epigenética verdadeira. Além disso, conforme mencionado anteriormente, em contraste com a informação genética, que é altamente estável, a informação epigenética apresenta elevado grau de plasticidade e é inerentemente reversível. Três critérios independentes devem ser atendidos para que um determinado sinal molecular possa ser, de fato, considerado epigenético:[23]

- Ter um mecanismo de autopropagação, isto é, caminhos que expliquem como a assinatura molecular é fielmente reproduzida após a replicação do DNA e a divisão celular.
- Ser hereditário, ou seja, apresentar forma de transmissão autossustentada para os descendentes.
- Ser reversível.

Nesse sentido, a metilação do DNA satisfaz os três requisitos; entretanto, o caso das modificações pós-traducionais das histonas e dos miRNA é menos claro. Evidências experimentais da transmissão desses sinais epigenéticos para as células-filhas ainda são escassas. Este tópico abordará as três principais modificações epigenéticas que regulam o acesso da maquinaria de transcrição à cromatina.

Metilação do DNA

A metilação do DNA é a modificação epigenética mais amplamente estudada em mamíferos. Ela fornece um mecanismo estável de silenciamento com papel fundamental na regulação da expressão gênica e na organização da arquitetura da cromatina.[50] A metilação do DNA resulta da adição covalente de um grupo metil a resíduos de citosina que pertencem a dinucleotídeos CpG, estando comumente associada ao silenciamento de genes e de regiões genômicas não codificantes (Figura 5.2).[51] A distribuição de grupos metil no genoma não é homogênea e frequentemente encontra-se em regiões chamadas ilhas CpG e em amplas regiões repetitivas (p. ex., regiões centroméricas e elementos retrotransponíveis).[52,53]

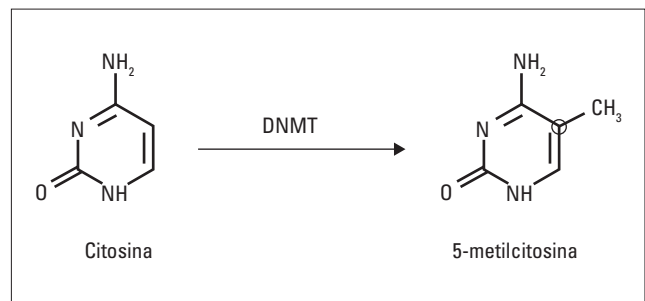



Figura 5.2 Mecanismo de metilação do DNA, processo que envolve a adição de um grupo metil (CH_3) à posição 5 do resíduo de citosina, a qual é mediada por uma família de enzimas chamada DNA metiltransferases (DNMT). A metilação do DNA ocorre quase exclusivamente em dinucleotídeos CpG.

Ilhas CpG são regiões que ocorrem preferencialmente na porção 5' de genes que apresentam um conteúdo de GC de pelo menos 50% e uma razão da frequência de CpG esperada de mais de 60%.[53,54] Cerca de 60% dos promotores de genes humanos contêm ilhas CpG, que geralmente se encontram não metiladas nas células normais, estando associadas, principalmente, a genes constitutivos envolvidos na manutenção do funcionamento normal da célula e expressos na maioria dos tecidos.[53] A metilação de ilhas CpG está associada com o silenciamento gênico, atuando na regulação do nível de expressão em diferentes processos, como na expressão gênica tecido-específica, no *imprinting* genômico e na inativação de um dos cromossomos X em mulheres (Figura 5.3).[28,53,55]

Em contraste, sítios CpG isolados ocorrem em sequências genômicas repetitivas espalhadas pelo genoma e são amplamente metilados, evitando a reativação de sequências que causam instabilidade cromossômica e silenciando regiões de DNA não codificante.[56,57]

O estabelecimento e a manutenção de padrões de metilação são realizados por uma família de enzimas chamadas DNMT, essenciais para a manutenção de padrões adequados de expressão gênica.[58] São enzimas que catalisam a transferência de um grupo metil de uma molécula doadora, a S-adenosilmetionina (SAM), às citosinas localizadas a 5' de guaninas. Em mamíferos, cinco isoformas da família DNMT foram descritas: DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b e DNMT3L.[51] No entanto, somente DNMT1, DNMT3a e DNMT3b possuem o domínio catalítico de metiltransferases. Os membros catalíticos da família das DNMT são geralmente classificados em DNMT *de novo* (DNMT3a e DNMT3b) e DNMT de manutenção (DNMT1).[59]

Os padrões de metilação em mamíferos são determinados nas primeiras fases do desenvolvimento pelas metiltransferases *de novo* DNMT3a e DNMT3b que catalisam a metilação de sítios CpG não metilados. Essas DNMT são altamente expressas nos primeiros estágios do desenvolvimento embrionário, quando ocorre a maior parte dos eventos programados de metilação *de novo*, e apresentam baixa expressão em células já diferenciadas.[51,59]

A DNMT1 é a isoforma mais abundante nas células. Esta enzima tem uma preferência cerca de 30 a 40 vezes maior por DNA hemimetilado e atua na manutenção dos padrões de metilação preexistentes durante a replicação semiconservativa do DNA.[51,59] O mecanismo para manutenção depende basicamente do padrão de metilação da cópia semiconservativa que passa da fita parental para a fita recém-sintetizada, reproduzindo padrões de metilação de DNA entre gerações de células.[51] A afinidade da DNMT1 pelo DNA recém-sintetizado é aumentada por meio de sua interação com a proteína PCNA (*DNA poly-*

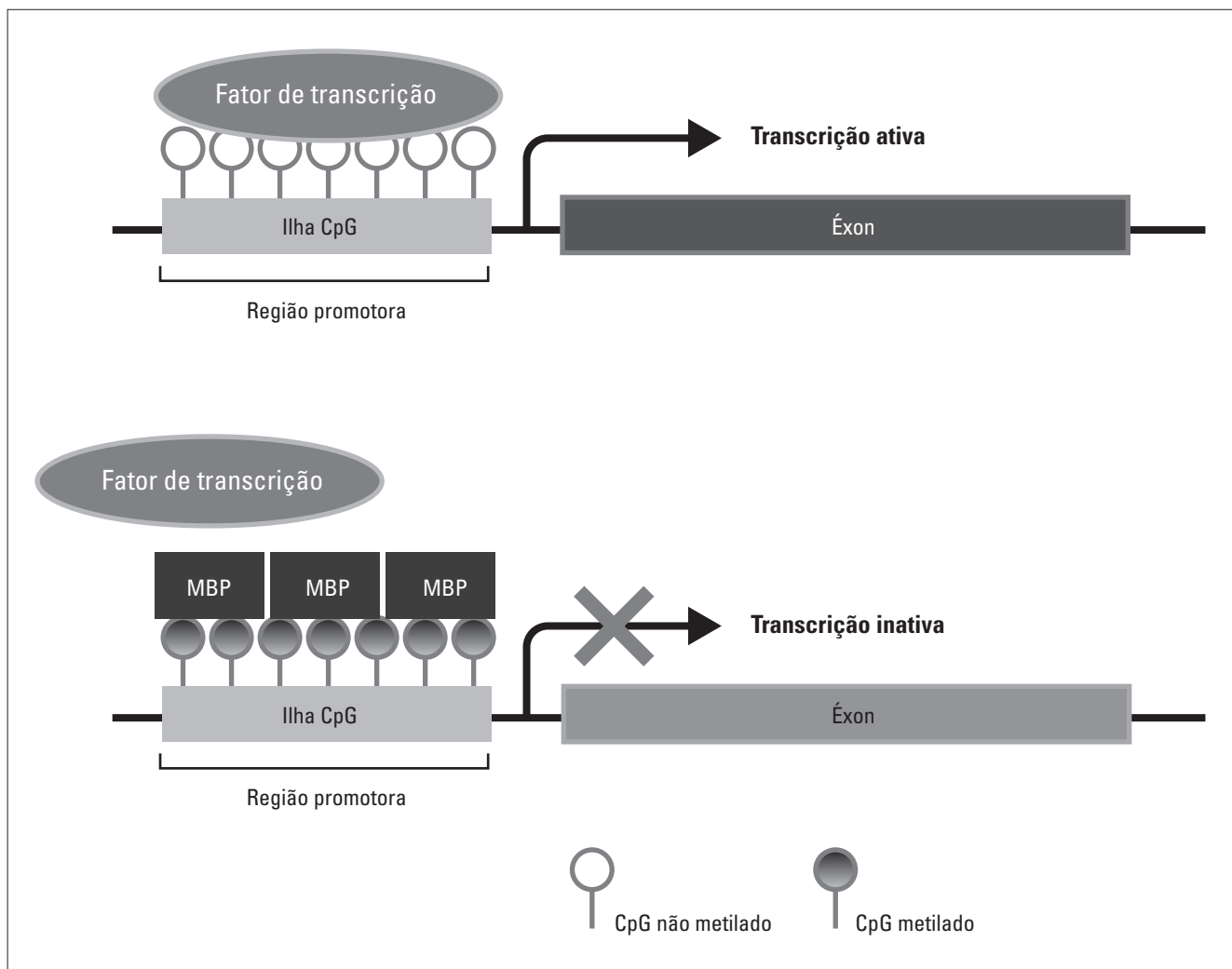



Figura 5.3 Sítios CpG no genoma não são distribuídos aleatoriamente. Ilhas CpG são encontradas na região promotora de genes e geralmente não estão metiladas. Quando presentes na região promotora de genes que precisam ser silenciados, as ilhas CpG são altamente metiladas, levando ao silenciamento. MBP: proteínas ligadoras de metil.

merase processing factor proliferating cell nuclear antigen), que garante sua localização junto à forquilha de replicação,[61] e com a proteína UHRF1 (*ubiquitin-like plant homeodomain and RING finger domain-containing protein 1*), que facilita a ligação da DNMT1 aos sítios CpGs hemimetilados.[61]

A hipótese de uma associação entre a metilação do DNA e a regulação da expressão gênica surgiu após observar-se frequentemente que havia repressão da transcrição de genes quando existiam CpG metiladas dentro ou perto das suas sequências.[62]

Três possíveis mecanismos foram propostos para explicar o papel da metilação no silenciamento da transcrição gênica:[62,63]

- A interferência direta na ligação dos fatores de transcrição aos seus sítios de reconhecimento presentes nos promotores gênicos. Fatores de transcrição reconhecem sítios CpG e a presença de metilação nestes inibe sua ligação (p. ex., AP-2, c-Myc/Myn, ativador dependente de AMP ciclíco [CREB], E2F e NF-kB).
- O DNA metilado promove o recrutamento das proteínas ligadoras de metil (MBP – *methyl binding proteins*; exemplos de MBP: MeCP1 e MeCP-2), as quais são repressoras transcricionais e se ligam especificamente ao DNA metilado e, dessa forma, impedem a ligação dos fatores de transcrição.
- A ligação de MeCP-2 ao DNA recruta complexos proteicos de modificação de histonas (p. ex., histonas desacetilases [HDAC]), promovendo alteração da estrutura da cromatina, tornando-a mais condensada e, com isso, impedindo que os fatores de transcrição tenham acesso aos seus sítios-alvo.

Em contraste, ilhas CpG não metiladas geram uma estrutura de cromatina favorável à expressão gênica ao recrutarem o Cfp1, que se associa à histona metiltransferase Setd1, criando domínios ricos em histonas marcadas pela trimetilação da lisina 4 (H3K4me3),[64] tornando a estrutura da cromatina menos compacta e facilitando a transcrição.

Modificações de histonas

Como já mencionado, as proteínas histonas têm papel fundamental na formação da cromatina.[65] Sua estrutura, composta por um domínio C-terminal globular e uma cauda N-terminal, pode sofrer diversas modificações covalentes pós-traducionais, incluindo metilação, acetilação, ubiquitinação, sumoilação e fosforilação de resíduos específicos.[27,66] Essas modificações armazenam a memória epigenética no interior das células sob a forma de um código de histonas, atuando por meio de alterações na acessibilidade da cromatina ou por meio do recrutamento e/ou bloqueio de proteínas efetoras, responsáveis pela decodificação da mensagem contida nesse código. Dessa forma, efetuam os processos associados a cada padrão de modificação, como alterações em sua atividade, localização, degradação da sequência proteica, entre outros.[67,68] Assim, regulam processos celulares fundamentais, como transcrição, replicação, reparo do DNA, *splicing* alternativo e condensação cromossômica.[27,69]

Ao contrário da metilação do DNA, que geralmente induz o silenciamento gênico, modificações em histonas podem levar à ativação ou repressão da expressão gênica, dependendo de quais resíduos são modificados e do tipo de modificação presente.[49] Por exemplo, a acetilação de lisinas (K) geralmente correlaciona-se com a ativação, ao passo que a metilação leva à ativação ou à repressão da transcrição, dependendo do resíduo que é modificado (lisina ou arginina, respectivamente), do grau de metilação (mono, di ou trimetilação) e do sítio específico onde essa metilação ocorre (K4, K9 ou K20).[27] Essas modificações reversíveis garantem que genes específicos possam ser expressos ou silenciados de acordo com a fase do desenvolvimento ou em resposta a alterações bioquímicas, como variações nas concentrações hormonais, presença de diferentes componentes nutricionais ou modificações ambientais.[70,71]

Como descrito anteriormente, a cromatina pode ser classificada, de acordo com a sua conformação, em eucromatina e heterocromatina. De modo geral, a eucromatina ocorre em regiões com elevada atividade transcricional, sendo caracterizada por altos níveis de acetilação e pela trimetilação das lisinas 4, 36 e 79 da histona H3 (H3K4me3, H3K36me3 e H3K79me3). A heterocromatina é, por sua vez, transcricionalmente inativa, apresentando baixos níveis de acetilação e frequente metilação das lisinas 9 e 27 da H3 (H3K9me3, H3K27me3) e da lisina 20 da histona H4 (H4K20) (Figura 5.4).[27,72]

Padrões de transformações de histonas são regulados por enzimas capazes de adicionar e remover covalentes de suas caudas N-terminais. As histonas acetiltransferases (HAT) e as histonas metiltransferases (HMT) adicionam grupos acetil e metil, respectivamente, enquanto HDAC e histonas desmetilases (HDM) removem grupos acetil e metil, respectivamente (Figura 5.5).[73,74] Essas enzimas modificadoras de histonas interagem entre si e com outros mecanismos de regulação de DNA de forma a garantir o vínculo entre o estado da cromatina e a transcrição gênica.[49]

Dois complexos proteicos são fundamentais para o estabelecimento e a transmissão de estados de cromatina silenciada (grupo *polycomb*) ou ativa (grupo *trithorax*) du-

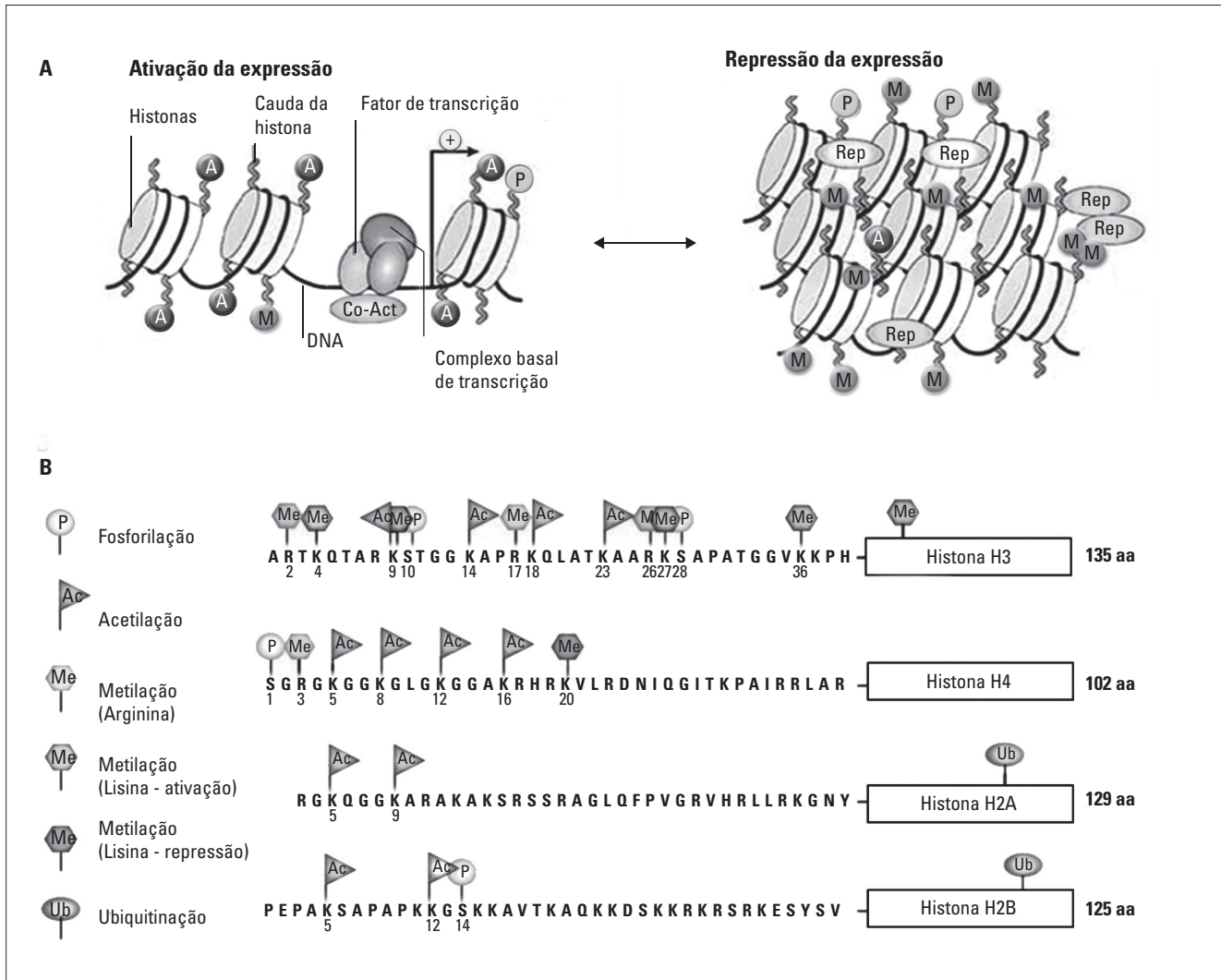



Figura 5.4 (A) Combinações de modificações nas histonas podem levar à ativação ou à repressão da expressão gênica. (B) Representação esquemática das principais modificações pós-transcricionais e seus sítios de ocorrência. A: acetilação; M: metilação; P: fosforilação. **Fonte:** adaptada de Tsankova et al.[76]

rante o desenvolvimento. O complexo *polycomb* de proteínas repressoras (PRC) é responsável por catalisar a trimetilação em H3K27 associada às regiões condensadas e inativas da cromatina. Já o complexo *trithorax* catalisa a trimetilação em H3K4, marca necessária para a manutenção de sítios ativos da cromatina durante o desenvolvimento.[75]

MiRNA

Biogênese de miRNA e a regulação da expressão gênica

Os miRNA são pequenas moléculas de RNA não codificantes que apresentam aproximadamente 22 nucleotídeos, com papel importante em virtualmente todas as vias biológicas em mamíferos e em outros organismos multicelulares. Mais de 1.400 miRNA humanos foram identificados, ilustrando o enorme potencial dessas moléculas na regulação da expressão gênica. Há estimativas de que cerca de 60% de todos os RNAm estejam sob o controle de miRNA.[78,79]

Para a maioria dos miRNA, produtos primários, chamados pri-miRNA, são transcritos pela RNA polimerase II, seja como unidades transcricionais independentes ou inseridas em íntrons de genes que codificam proteínas. Ainda no núcleo, um complexo contendo a RNAase III DROSHA realiza o processamento do pri-miRNA, permitindo a formação de uma estrutura em forma de grampo de cabelo (*hairpin*) denominada pré-miRNA, a qual é exportada para o citoplasma pela exportina-5. No citoplasma, um complexo proteico contendo a enzima DICER processa o pré-miRNA, gerando um miRNA de fita simples maduro que é incorporado ao complexo de silenciamento do RNAm (RISC, *RNA-induced silencing*

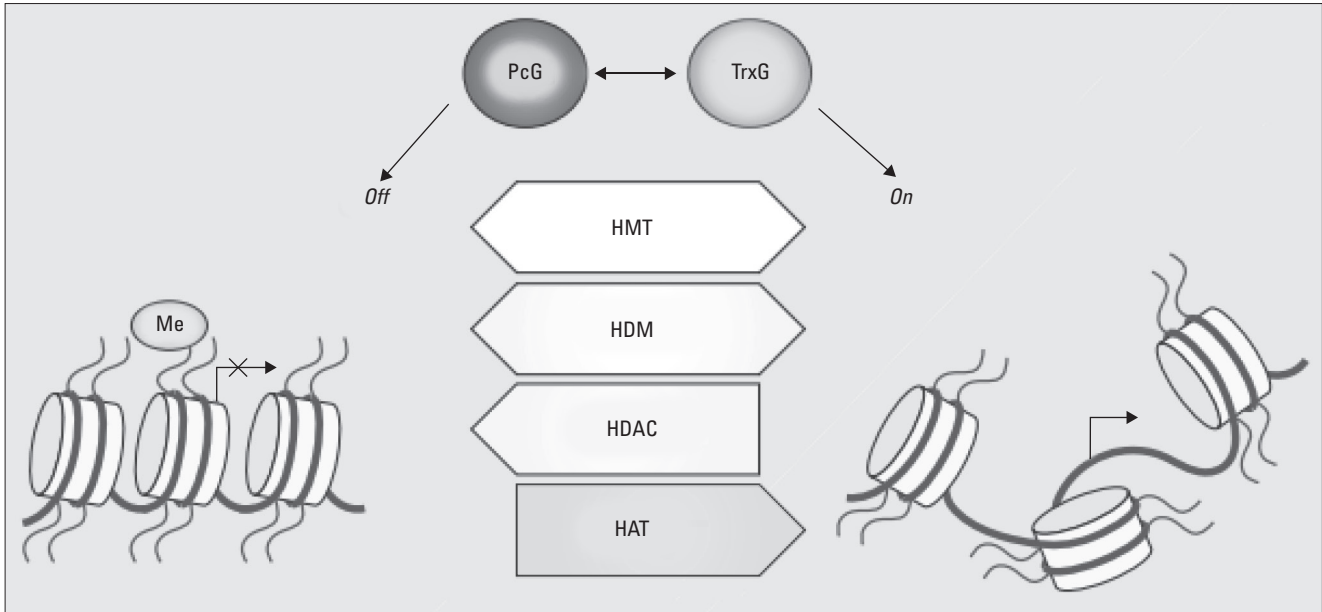



Figura 5.5 Modificações covalentes de histonas. A estrutura da cromatina é regulada pelo complexo *polycomb* (PcG) e *trithorax* (TrxG) que, por meio da atividade das enzimas HMT, HDM, HDAC e HAT, catalisam a adição e a remoção de resíduos acetil e metil que mantêm a cromatina em estado *on* (ativo) ou *off* (inativo). **Fonte:** adaptada de Mills (2010).[77]

complex). Esse complexo RISC contendo o miRNA será responsável por induzir o silenciamento pós-transcricional de genes por meio da interação entre miRNA e sequências localizadas na região 3' não traduzida (3' UTR) de RNAm.[42]

A ligação entre miRNA e RNAm alvo ocorre por complementaridade entre as suas sequências. Quando essa complementaridade é completa, o miRNA pode induzir à degradação do seu RNAm alvo. Entretanto, quando a complementaridade é incompleta, pode ocorrer a repressão da tradução. Nesses casos, porém, não há indução da degradação do RNAm alvo (Figura 5.6).[79-81]

Os miRNA têm expressão tecido-específica e são capazes de controlar grande variedade de processos biológicos com papel importante na manutenção de padrões de expressão gênica global.[82] Como ocorre no caso dos genes, a expressão dos miRNA pode ser regulada por mecanismos epigenéticos.[83] Além disso, os miRNA também podem modular outros eventos epigenéticos dentro de uma célula, no estabelecimento de padrões de metilação ou na regulação da estrutura da cromatina, direcionando enzimas responsáveis pela metilação do DNA (DNMT3a e DNMT3b) e de modificações de histonas (PRC).[86-88] Essa interação entre os vários componentes da maquinaria epigenética enfatiza a natureza integrada de eventos epigenéticos envolvidos na manutenção de padrões de expressão gênica global.[42]

Assim, as células apresentam a capacidade de modificar suas atividades bioquímicas de acordo com os estímulos transitórios que recebem do ambiente, como a ingestão de alimentos e o gasto energético. Isso ocorre via modulação da expressão de genes, por meio de diferentes eventos epigenéticos. Dessa forma, a célula pode ajustar os níveis de expressão de genes de acordo com condições ambientais e nutricionais específicas.[87]

EPIGENÔMICA NUTRICIONAL

Conceitos

Alterações na expressão de genes ocasionadas por variações na molécula de DNA (polimorfismos de nucleotídeo único, deleções e/ou mutações) são irreversíveis, enquanto aquelas que ocorrem por meio de eventos epigenéticos (metilação do DNA, alterações em histonas e regulação por miRNA) são potencialmente reversíveis, especialmente pela influência de moléculas que atuam modulando os mecanismos epigenéticos. Nesse contexto, nutrientes e CBA podem modular tais eventos de forma a promover ou prejudicar a saúde, induzindo o silenciamento ou a ativação transcricional de genes específicos, que, em última instância, alteram a função e o metabolismo celular.[89,90] As evidências de que eventos epigenéticos podem auxiliar na elucidação dos mecanismos envolvidos na interação entre o genoma e a alimentação têm despertado a atenção de muitos pesquisadores e deram origem a uma subdisciplina da genômica nutricional, a epigenômica nutricional.[90-92]

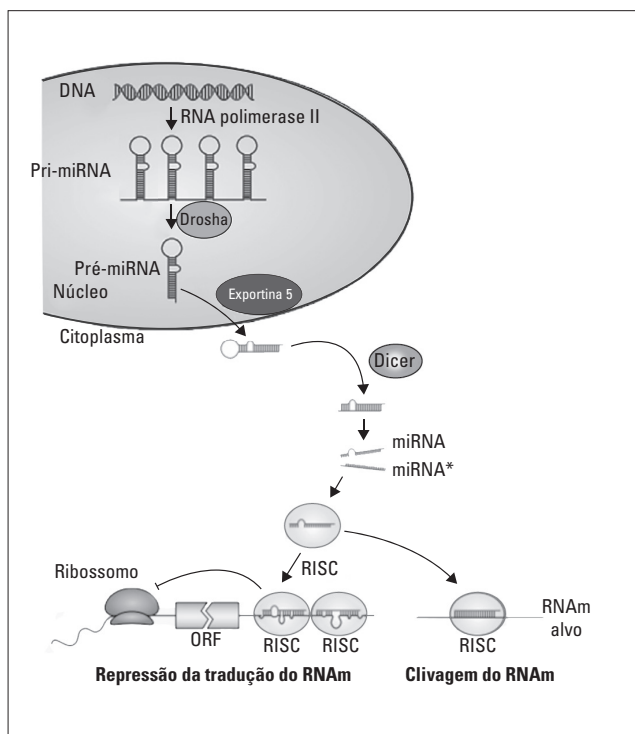



Figura 5.6 Biogênese de miRNA. No núcleo, produtos primários (pri--miRNA) são transcritos a partir do DNA pela RNA polimerase II. O complexo proteico DROSHA realiza a clivagem do pri-miRNA, o que dá origem a um pré-miRNA (estrutura em forma de grampo de cabelo – *hairpin*), que é exportado para o citoplasma pela exportina-5. No citoplasma, a enzima DICER cliva o pré-miRNA, gerando o miRNA e o seu complementar miRNA*, ambos fita simples, mas com apenas um deles sendo incorporado ao complexo RISC. Este, contendo o miRNA, é responsável por induzir o silenciamento pós-transcricional. Quando a complementaridade entre miRNA e RNAm alvo é completa, o miRNA pode induzir a clivagem do seu RNAm alvo. Quando a complementaridade é incompleta, ocorre a repressão da tradução. **Fonte:** adaptada de Chuang e Jones.[42]

Alguns nutrientes que modulam eventos epigenéticos incluem aminoácidos, mas não se limitam a eles, como lisina (necessários para as modificações de resíduos de histona); metionina (precursor da SAM, doador de CH3); ácidos graxos de cadeia curta, como o ácido butírico; vitaminas ou compostos essenciais semelhantes, especialmente as vitaminas B_2, B_6, B_{12} e ácido fólico; colina e betaína; e minerais como o magnésio e o zinco.[93] Esses nutrientes promovem a manutenção da arquitetura epigenética da cromatina durante toda a vida e, quando faltam ou estão em excesso, podem acarretar padrões epigenéticos aberrantes associados com maior risco de defeitos graves de formação do tubo neural, de resistência à insulina e de autismo, entre outras condições clínicas e doenças.[94]

Eventos epigenéticos podem ser modulados de acordo com o ambiente; assim, eles oferecem outra explicação para como a alimentação pode influenciar os processos biológicos e determinar fenótipos. Em estudos de genômica nutricional, a epigenética é excepcionalmente importante porque os nutrientes e CBA podem modificar eventos epigenéticos e alterar a expressão de genes. Por exemplo, a ingestão alimentar – principalmente de folato, metionina, colina e vitaminas B_6 e B_{12} – influencia o metabolismo celular e o padrão de metilação do DNA e de histonas, especialmente porque esses nutrientes têm papel crítico na disponibilidade de grupamentos CH_3 e regulam coletivamente o metabolismo do um-carbono (vias de transferência de grupamentos CH_3 entre moléculas biológicas).[95]

Outras vitaminas do complexo B, como a biotina, a niacina e o ácido pantotênico, também desempenham papéis importantes em modificações de histonas. A biotina é um substrato para a biotinilação de histonas. A niacina está envolvida em adição de ADP-ribose às histonas (ribosilação) por ser substrato da poli-ADP-ribose polimerase, bem como da acetilação de histonas, como substrato da sirtuína 1 (Sirt1), enzima que atua como HDAC. O ácido pantotênico é componente da coenzima A (CoA), essencial para a formação de acetil-CoA, que é a doadora do grupo acetil para acetilação de histonas. Além disso, CBA afetam diretamente enzimas envolvidas em mecanismos epigenéticos. Por exemplo, a genisteína (soja) e as catequinas (chá-verde) modulam a atividade de DNMT. O resveratrol, o butirato, o sulforafano e o dialil sulfito são exemplos de inibidores de HDAC, enquanto a curcumina inibe a HAT.[10] A modulação da atividade de enzimas envolvidas em mecanismos epigenéticos pode influenciar processos fisiológicos e patológicos por meio da alteração da expressão gênica. Nesta seção, estão expostos alguns exemplos de epigenômica nutricional, o que será útil para a compreensão de como os nutrientes e CBA contribuem para a promoção da saúde.

Nutrição e metilação do DNA

Nutrientes específicos são necessários para impulsionar as vias metabólicas que resultam em metilação. Tanto a escassez quanto o excesso desses nutrientes podem afetar diretamente o epigenoma.[96] Por exemplo, o estado nutricional do indivíduo em relação a ácido fólico, vitamina B_{12}, metionina, colina e betaína pode influenciar o padrão de metilação do DNA e das histonas. Nesse sentido, dois intermediários do metabolismo do carbono merecem destaque: a SAM, que é um doador de grupamentos metil, e a S-adenosil-homocisteína (SAH), que é um inibidor de metiltransferases. Assim, teoricamente, qualquer nutriente, CBA ou condição que pode influenciar as concentrações de SAM ou SAH no tecido também modula as reações de metilação.[94]

Padrões de alimentação, como uma dieta com alto teor de lipídios, pode influenciar o estado de metilação do DNA. Observou-se que ratos tratados com ração normocalórica e hiperlipídica (60% do valor calórico total) apresentaram, no hipotálamo, metilação da região promotora do gene *Pomc*, essencial para o funcionamento adequado da via de sinalização antiobesidade dependente da leptina.[97]

O folato é o micronutriente mais extensivamente estudado com relação à metilação do DNA, especialmente por desempenhar papel único na geração de SAM. De maneira resumida, por meio de uma reação com gasto de energia (ATP), a metionina é convertida em SAM, doador celular universal de CH_3. Posteriormente, as DNMT transferem e fixam de maneira covalente grupos CH_3 provenientes da SAM no carbono-5 das bases citosinas em ilhas CpG no DNA, gerando 5-metilcitosina e, assim, a metilação do DNA propriamente dita. Após essa reação, a SAM é convertida em SAH, que colabora para o *pool* intracelular de homocisteína. Por outro lado, o folato proveniente da alimentação ou de suplementos na forma de ácido fólico é convertido a di-hidrofolato (DHF) e, subsequentemente, a tetra-hidrofolato (THF), que, a partir de uma reação dependente de vitamina B_6, é convertido a 5,10-metilenotetra-hidrofolato (5,10-MTHF), tornando-se assim substrato para a enzima metilenotetra-hidrofolato redutase (MTHFR), responsável pela conversão do 5,10-MTHF a 5-metiltetra-hidrofolato (5-MTHF). Este último é cossubstrato para a remetilação da homocisteína, o que origina a metionina (via metionina sintase – MS, dependente de vitamina B_{12}), a qual, por sua vez, é metabolizada para formar novamente SAM (Figura 5.7).[95]

Esse processo possibilita que o folato da alimentação entre no ciclo do carbono para reabastecer a concentração celular de SAM. Por isso, sugeriu-se que a suplementação com ácido fólico resultaria em aumento da metilação do DNA, enquanto a restrição desse nutriente ocasionaria hipometilação. No entanto, existem evidências conflitantes. Experimentos de suplementação/privação de folato mostram que ocorre o inverso do esperado com relação à metilação do DNA, o que indica que os mecanismos associados à influência dos micronutrientes na regulação epigenética são mais complexos do que se pensava inicialmente.[98,99] Estudos com animais mostram que dietas deficientes em metionina, colina, vitamina B_{12} ou folato induzem a hipometilação global como esperado, porém resultam em hipermetilação das regiões promotoras de genes supressores tumorais, e essa condição é associada ao aumento do risco para o desenvolvimento de câncer.[99]

A colina é um doador indireto de metil para o metabolismo do carbono, uma vez que é oxidada a betaína e esta, por sua vez, doa um grupo metil para a homocisteína, auxiliando na sua conversão a metionina e contribuindo, assim, para a homeostase dessa substância.[95] Fontes nutricionais de colina incluem ovos, gérmen de trigo e brócolis. A deficiência desse nutriente em adultos pode resultar em alterações epigenéticas e em hiper-homocisteinemia associadas à disfunção de órgãos, particularmente em esteatose hepática.[100]

No contexto da bioquímica nutricional, é relevante destacar que a via de metabolismo do carbono é cíclica e é regenerada por meio de micronutrientes provenientes da alimentação. Além do folato e da colina, outros nutrientes também participam do metabolismo do carbono, atuando como doadores de CH_3 ou como cofatores de enzimas que contribuem para o ciclo.[95] A vitamina B_{12}, na forma de metil-malonil-cobalamina, é cofator essencial para a enzima MTR. A vitamina B_6, a riboflavina e o zinco são cofatores essenciais para enzimas envolvidas nas várias etapas do ciclo do carbono.[99]

Além dos nutrientes, os CBA também são capazes de modular eventos epigenéticos. Em culturas de células de câncer, a apigenina (presente no aipo e na salsa) e a luteolina (encontrada na cebola, na couve-flor e no brócolis) inibiram a atividade de DNMT e HDAC, com consequente aumento da apoptose e redução da proliferação celular. Já a quercetina (presente principalmente na cebola e em hortaliças verde-escuras) parece exercer atividades anticarcinogênicas em culturas celulares de câncer de próstata, por meio da reativação de genes supressores tumorais que estão normalmente metilados nesses tumores, como o *P16INK4a*. O chá-verde tem despertado interesse dos pesquisadores por suas propriedades benéficas à saúde atribuídas às catequinas, especialmente a epigalocatequina-3-galato, que apresenta atividade inibitória de DNMT. Por sua vez, o resveratrol, encontrado no vinho tinto, parece reduzir a metilação da região promotora e, assim, promover a reativação da expressão do *PTEN*, um importante supressor tumoral, em cultura de células de câncer de mama.[101]

Nutrição e modificações pós-traducionais em histonas

Padrões de alimentação podem modular a atividade de HDAC e influenciar eventos biológicos. Por exemplo, a restrição calórica, quando não acompanhada de deficiências nutricionais, parece estar relacionada à longevidade. Esse efeito em humanos baseia-se em dados epidemiológicos e, nesse sentido, a população excepcionalmente longeva residente na ilha japonesa de Okinawa serve como

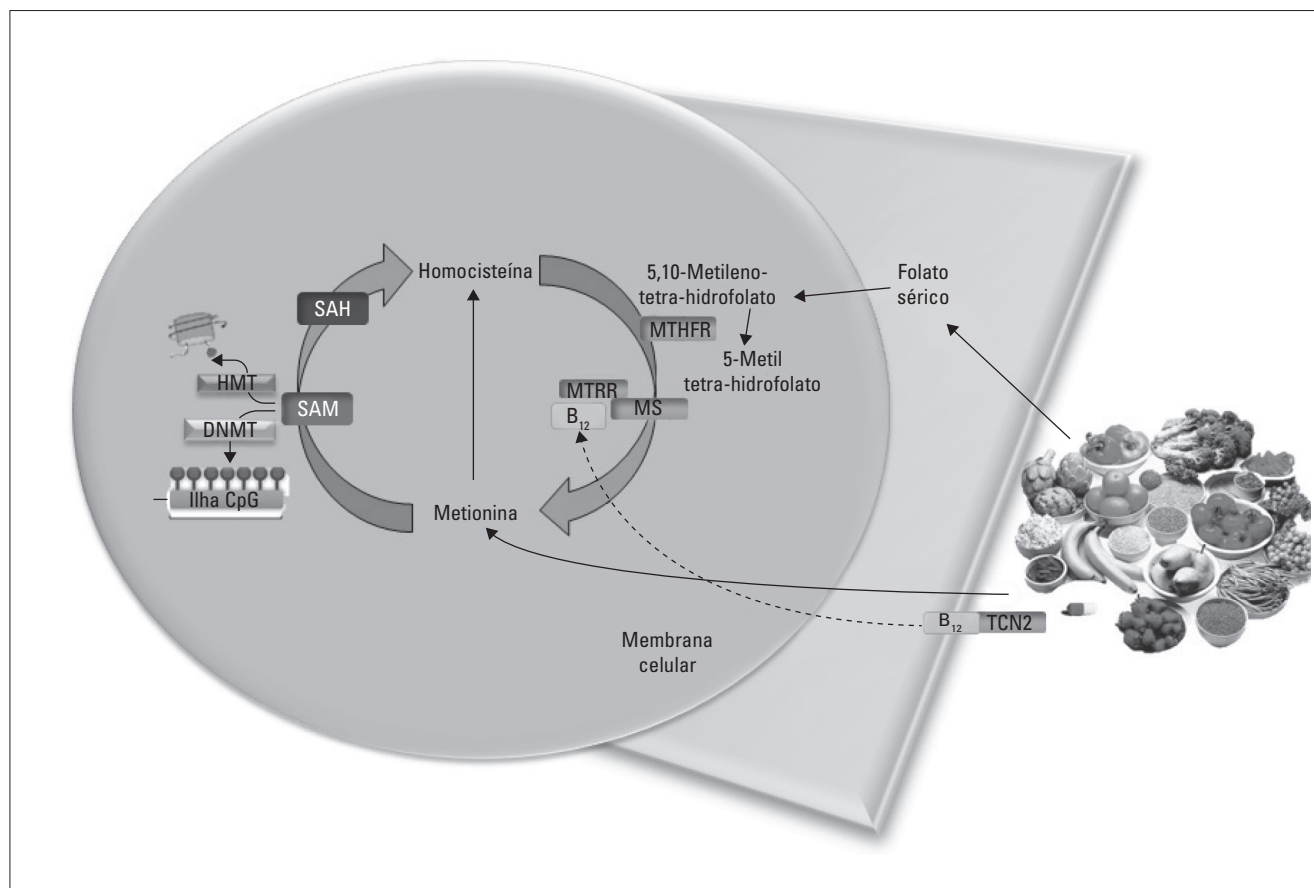



Figura 5.7 Resumo do metabolismo do um-carbono. DNMT: DNA metiltransferase; HMT: histona metiltransferase; MS: metionina sintase; MTHFR: metilenotetra-hidrofolato redutase; MTRR: metionina sintase redutase; SAH: S-adenosil-homocisteína; SAM: S-adenosilmetionina; TCN2: transcobalamina 2.

exemplo.[102] Uma ampla revisão sobre o tema sugere que o efeito na longevidade pode ser, em parte, mediado pela modulação de eventos epigenéticos, uma vez que a restrição calórica ocasiona ativação da HDAC da classe III, também conhecida como SIRT1. Em mamíferos, a SIRT1 tem sido considerada proteína-chave na resposta da restrição calórica em eventos biológicos, uma vez que ela regula o metabolismo energético no hipotálamo e é induzida por equilíbrio energético negativo, sendo, portanto, ativada em resposta à restrição calórica. A SIRT1 também induz a desacetilação de histonas associadas aos genes *FOXO1*, *FOXO3a* e *FOXO4*, resultando em modulação do ciclo celular, aumento das defesas contra espécies reativas de oxigênio (ERO) e redução da apoptose.[103] Além disso, experimento com camundongos transgênicos (com bloqueio ou aumento da expressão de proteína homóloga a SIRT1) demonstrou que essa proteína interage com regiões repetitivas de telômeros e atenua o seu encurtamento, reduzindo significativamente o envelhecimento dos animais.[104] Assim, a restrição calórica parece aumentar a longevidade do organismo por meio de diversas vias orquestradas pela SIRT1. Mais detalhes sobre envelhecimento e genômica nutricional são abordados no Capítulo 32.

Já se sabe que alguns CBA apresentam capacidade de inibir HDAC. Por exemplo, derivados alílicos presentes no alho apresentam a capacidade de modular o padrão de acetilação das histonas. Entre os CBA caracterizados como inibidores de HDAC (iHDAC) estão o sulforafano (SFN) isolado a partir de hortaliças crucíferas; a quercetina, encontrada em várias frutas; e o ácido butírico, presente em pequenas quantidades no mel e na gordura do leite, porém amplamente produzido a partir da fermentação intestinal de fibras alimentares. Estudos de modulação de eventos epigenéticos com outros compostos alimentares, como a biotina, a vitamina E e os metabólitos do ácido alfalipoico, sugerem que estes também possam atuar como iHDAC.[105] Diante da possibilidade de que iHDAC possam atuar na terapia de diversas doenças, especialmente o câncer, há interesse crescente no potencial de compostos alimentares que possam exercer tal atividade.

Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC – acetato, propionato e butirato), produzidos no cólon durante a fer-

mentação de fibras alimentares, são conhecidos como iHDAC e colaboram para a manutenção do estado relaxado da cromatina, especificamente em regiões de genes supressores tumorais como o *P21*. Nesse sentido, o ácido butírico é o AGCC mais estudado. Experimentos com camundongos C57BL/6J mostraram que o butirato de sódio é capaz de impedir o aumento do peso corporal e reduzir a adiposidade, induzidos por ração rica em lipídios, sem alterar a ingestão de alimentos ou o gasto energético. Tais resultados foram modulados por eventos epigenéticos, pois observou-se um padrão de conformação da cromatina semelhante entre animais que receberam ração com alto teor de lipídios acrescida de ácido butírico e animais tratados com ração de baixo teor de lipídios. Esse padrão de conformação da cromatina observado nos dois grupos foi diferente daquele verificado em animais tratados com ração com alto teor de lipídios e ausência do ácido butírico.[106]

A epigalocatequina 3-galato (EGCG), principal CBA presente no chá-verde, tem o potencial de influenciar o risco de câncer por meio de ação epigenética dupla. Em cultura de melanócitos humanos, o tratamento com concentrações de até 20 μg/mL de EGCG resultou em redução da atividade de HDAC e em aumento da acetilação da H4 nos resíduos de lisina 5, 12 e 16 e da H3 nos resíduos de lisina 9 e 14, bem como reduziu os níveis de H3K9 metilada. Tais modificações, por sua vez, induziram a ativação transcricional de genes supressores de tumor, verificada pelo aumento da expressão proteica de p16INK4a e Cip1/p21.[107]

Nutrição e expressão de miRNA

Evidências sugerem que a alimentação possa influenciar o risco do desenvolvimento de doenças por meio da modulação da expressão de miRNA.[108] Em modelo experimental com camundongos, utilizando rações hiperlipídicas (60% do valor energético total da dieta) durante cinco meses para indução da obesidade, encontrou-se expressão diferencial de 26 miRNA em comparação ao tecido adiposo de animais tratados com ração controle (10% de lipídios em relação ao valor energético total). Entre os miRNA hiperexpressos estavam miR-342-3p, miR-222, miR-221, miR-142-3p, miR-142-5p, miR-21, miR-335-5p, miR-146a, miR-146b, miR-647* e miR-379. Por outro lado, miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-122, miR-204, miR-133b, miR-1, miR-30a*, miR-130a, miR-192, miR-193a-3p, miR-203, miR-378 e miR-30e* encontravam-se hipoexpressos. Esses miRNA parecem estar envolvidos na modulação da tradução de proteínas envolvidas na obesidade e na adipogênese.[109]

O miR-21 está envolvido no controle da diferenciação adipogênica de células mesenquimais por meio da modulação da via de sinalização do TGF-beta[110] e na regulação da proliferação de células precursoras de adipócitos, tanto na fase inicial da obesidade quanto em fases mais avançadas, induzindo a diferenciação adipogênica de tais células.[111] Esses resultados podem contribuir para o direcionamento de intervenções que possam regular a expressão do miR-21 no sentido de reduzir o risco de obesidade ou até mesmo no tratamento de pacientes obesos. O tratamento de ratas, desde a concepção até 12 dias de gestação, com dietas à base de diferentes fontes de lipídios (óleo de soja 9%; óleo de oliva 9%; óleo de peixe 8% + 1% óleo de semente de girassol; óleo de linhaça 8% + 1% óleo de semente de girassol; ou óleo de palma + 1% óleo de soja) influenciou a expressão de diversos miRNA, tanto nas mães quanto na prole, com destaque para os óleos de peixe e oliva que foram capazes de reduzir a expressão do miR-21.[112]

Ácidos graxos poli-insaturados são preconizados como supressores da carcinogênese de cólon e, embora os mecanismos ainda não estejam completamente elucidados, sugere-se que a modulação da expressão de miRNA esteja envolvida nesse processo. Davidson et al.[113] identificaram, em modelo experimental de câncer de cólon, ação quimiopreventiva de rações enriquecidas com óleo de peixe (11,5 g/100 g de dieta) associada à modulação da expressão de miRNA envolvido com a carcinogênese.

Hu et al.[99] mostraram que, após o tratamento de células humanas de câncer de cólon (HCT-116) com butirato, a expressão de vários miRNA dos *clusters* miR-17~92, miR-18b~106a e miR-106b~25 foi significativamente reduzida. Além disso, identificaram que o gene supressor de tumor *CDKN1A* (também conhecido como *P21*) é alvo direto do miR-106b. Esses dados indicam que os AGCC regulam a expressão gênica por meio da modulação da expressão de miRNA implicados na homeostase intestinal e na transformação maligna. De maneira interessante, quando ácidos graxos da série ômega-3 (docosa-hexaenoico [DHA] e eicosapentaenoico [EPA]) foram combinados com fibra fermentável (pectina) e adicionados à ração de ratos submetidos à aplicação de carcinógenos, houve aumento da expressão de miR-19b, miR-26b, miR-27b, miR-200c e miR-203 e redução da expressão proteica dos seus alvos preditos, alguns dos quais têm sido relacionados com a carcinogênese. Esses resultados sustentam a alegação de que DHA, EPA e butirato atuam de maneira sinérgica na proteção contra o desenvolvimento de neoplasias no cólon.[114] Outra cooperação interessante entre CBA foi destacada por Wolter e Stein,[115] que demonstraram que o resveratrol intensificou os efeitos indutores de diferenciação celular do butirato em cé-

lulas de câncer colorretal, por meio da modulação da expressão de miRNA.

Um estudo examinando o metabolismo hepático de camundongos geneticamente modificados para apolipoproteína E demonstrou que, após suplementação nutricional de polifenóis, em doses que podem ser alcançadas por meio da alimentação humana, as funções celulares foram moduladas por alterações na expressão de miRNA. Especificamente, a exposição independente a nove polifenóis distintos (quercetina, hesperidina, naringina, antocianinas, catequinas, proantocianidinas, ácido cafeico, ácido ferúlico e curcumina) modulou a expressão de um grupo de cinco miRNA (miR-30c, miR-291B-5p, miR-296-5p, miR -373 e miR-467B), sugerindo um mecanismo de ação comum para os polifenóis.[116] Coletivamente, esses estudos sugerem que os CBA exercem seus efeitos preventivos, em parte, por meio da modulação da expressão de miRNA específicos.

Demonstrou-se também que ração deficiente em doadores de radical metil pode resultar em alteração na expressão de miRNA, incluindo a regulação negativa de miR-34a, miR-127 e miR-200b no fígado de ratos submetidos a modelo de hepatocarcinogênese experimental.[117] Como miRNA são considerados alvos promissores para intervenções nutricionais na promoção da saúde, muitos grupos de pesquisa têm tentado compreender os mecanismos complexos envolvidos nessa relação. Entretanto, ainda não se tem uma recomendação nutricional definitiva para modulação da expressão dessas moléculas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos últimos anos, vários estudos têm considerado a epigenômica um "epicentro" da medicina moderna, pois ela tem auxiliado na elucidação da relação entre o genoma individual e o ambiente. Além disso, as alterações epigenéticas aberrantes podem resultar no surgimento ou na progressão de diferentes doenças. A epigenética desperta muito interesse especialmente porque eventos epigenéticos são herdáveis, podem ser modulados por fatores ambientais, têm a capacidade de alterar a expressão gênica e, ainda, são potencialmente reversíveis.[41] Entretanto, ao contrário do genoma, cuja informação está alocada no DNA de forma permanente, o epigenoma é dinâmico e diferente em cada célula ou tecido corporal e altamente responsivo a alterações ambientais, o que muitas vezes dificulta estabelecer a relação entre alterações epigenéticas, manutenção da saúde e intervenções nutricionais. Assim, espera-se que, com o avanço de tecnologias de análise do epigenoma e a evolução de métodos de bioestatística e bioinformática, os conhecimentos gerados a partir da epigenômica nutricional possam ser cada vez mais aplicados na prática clínica e na promoção da saúde.

REFERÊNCIAS

1. Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. Proc Natl Acad Sci USA. 2005;102(30):10604-9.
2. Humpherys D, Eggan K, Akutsu H, Hochedlinger K, Rideout WM 3rd, Biniszkiewicz D et al. Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. Science. 2001;293(5527):95-97.
3. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. Nature. 1953;171(4356):737-38.
4. Kaminsky ZA, Tang T, Wang SC, Ptak C, Oh GH, Wong AH et al. DNA methylation profiles in monozygotic and dizygotic twins. Nat Genet. 2009;41(2):240-45.
5. Tollefsbol T. Cancer epigenetics. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis Group; 2009.
6. Jirtle RL, Skinner MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. Nat Rev Genet. 2007;8:253-62.
7. Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H, Blauw GJ, Susser ES et al. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. Proc Natl Acad Sci USA. 2008;105:17046-49.
8. Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR et al. Epigenetic programming by maternal behavior. Nat Neurosci. 2004;7:847-54.
9. Bateson P, Barker D, Clutton-Brock T, Deb D, D'Udine B, Foley RA et al. Developmental plasticity and human health. Nature. 2004;430(6998):419-21.
10. Supic G, Jagodic M, Magic Z. Epigenetics: a new link between nutrition and cancer. Nutr Cancer. 2013;65(6):781-92.
11. Boks MP, de Jong NM, Kas MJ, Vinkers CH, Fernandes C, Kahn RS et al. Current status and future prospects for epigenetic psychopharmacology. Epigenetics. 2012;7(1):20-28.
12. Handel AE, Ebers GC, Sreeram V. Ramagopalan epigenetics: molecular mechanisms and implications for disease. Trends Molec Med. 2010;16(1):7-16.
13. Esteller M. Epigenetics in cancer. N Engl J Med. 2008;358:1148-59.
14. Dolinoy DC, Das R, Weidman JR, Jirtle RL. Metastable epialleles, imprinting, and the fetal origins of adult diseases. Pediatr Res. 2007 May;61(5 Pt 2):30R-37R.
15. Ringrose L, Paro L. Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins. Annu Rev Genet. 2004;38:413.
16. Zoghbi H, Beaudet A. Epigenetics and human disease. In: Allis C, Jenuwein T, Reinberg D (eds.). Epigenetics. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2007.
17. Waddington CH. The epigenotype. Endeavour. 1942:18-20.
18. Nanney LD. Epigenetic control systems. Proc Natl Acad Sci USA. 1958;44(712).
19. Holliday R. The inheritance of epigenetic defects. Science. 1987;238:163-70.
20. Hurd PJ. The era of epigenetics. Brief Funct Genomics. 2010;9(5-6):425-28.
21. Bird A. Perceptions of epigenetics. Nature. 2007;447(7143):396-98.
22. Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R, Shilatifard A. An operational definition of epigenetics. Genes Dev. 2009;23:781.

23. Bonasio R, Tu S, Reinberg D. Molecular signals of epigenetic states. Science. 2010;330(6004):612-16.
24. Dennis C. Epigenetics and disease: altered states. Nature. 2003;421:686-88.
25. Talbert PB, Henikoff S. Histone variants: ancient wrap artists of the epigenome. Nat Rev Mol Cell Biol. 2010;11(4):264-75.
26. Cairns BR. The logic of chromatin architecture and remodelling at promoters. Nature. 2009;461(7261):193-98.
27. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. Cell. 2007;128(4):693-705.
28. Reik W, Lewis A. Co-evolution of X-chromosome inactivation and imprinting in mammals. Nat Rev Genet. 2005;6:403-10.
29. Feinberg C, Ohlsson R. DNA methylation and genomic imprinting: insights from cancer into epigenetic mechanisms. Semin Cancer Biol. 2002;12:389-98.
30. Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. Hum Mol Genet. 2000 Oct;9(16):2395-402.
31. Espada J, Carrasco E, Calvo MI. Standard DNA methylation analysis in mouse epidermis: bisulfite sequencing, methylation-specific PCR, and 5-methyl-cytosine (5mC) immunological detection. Methods Mol Biol. 2014;1094:221-31.
32. Xu GL, Bestor TH, Bourchis D, Hsieh CL, Tommerup N, Bugge M et al. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. Nature. 1999;402:187-91.
33. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Biologia molecular da célula. 5.ed. São Paulo: Artmed; 2008.
34. Cutter AR, Hayes JJ. A brief review of nucleosome structure. FEBS Lett. 2015;pii:S0014-5793(15)00392-0.
35. Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome: biological and translational implications. Nat Rev Cancer. 2011;11:726-34.
36. Wu H, Zhang Y. Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5-methylcytosine oxidation. Genes Dev. 2011;25:2436-52.
37. Tan M, Luo H, Lee S, Jin F, Yang JS, Montellier E et al. Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. Cell. 2011;146:1016-28.
38. Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy mark A. Cell. 2012;150(1):12-27.
39. Esteller M, Tortola M, Toyota G, Capella MA, Peinado S, Baylin B et al. Hypermethylation-associated inactivation of p14ARF is independent of p16INK4a methylation and p53 mutational status. Cancer Res. 2000;60(1):129.
40. Wang GG, Allis CD, Chi P. Chromatin remodeling and cancer, part I: covalent histone modifications. Trends Mol Med. 2007;13:363-72.
41. Choi SW, Friso S. Epigenetics: A New Bridge between Nutrition and Health. Adv Nutr. 2010 Nov;1(1):8-16. doi: 10.3945/an.110.1004.
42. Chuang JC, Jones PA. Epigenetics and miRNAs. Pediatr Res. 2007;61(5 Pt 2):24R-29R.
43. Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, Fraga MF, Cerrato C, Setién F et al. Genetic unmasking of an epigenetically silenced miRNA in human cancer cells. Cancer Res. 2007;67:1424-29.
44. Saito Y, Liang G, Egger G, Friedman JM, Chuang JC, Coetzee GA et al. Specific activation of miRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. Cancer Cell. 2006;9:435-43.
45. Kelly TK, Miranda TB, Liang G, Berman BP, Lin JC, Tanay A. H2A.Z maintenance during mitosis reveals nucleosome shifting on mitotically silenced genes. Mol Cell. 2010;39(6):901-11.
46. Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. Nature. 2009;462:315-22.
47. Mikkelsen TS, Hanna J, Zhang X, Ku M, Wernig M, Schorderet P et al. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. Nature. 2008;454(7200):49-55.
48. Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, Issac B, Lieberman E, Giannoukos G et al. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. Nature. 2007;448(7153):553-60.
49. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. Carcinogenesis. 2010;31(1):27-36.
50. Rodriguez-Paredes M, Esteller M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. Nat Med. 2011;17(3):330-39.
51. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. Genes Dev. 2002;16(1):6-21.
52. Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. Proc Natl Acad Sci USA. 2002;99(6):3740-45.
53. Straussman R, Nejman D, Roberts D, Steinfeld I, Blum B, Benvenisty N et al. Developmental programming of CpG island methylation profiles in the human genome. Nat Struct Mol Biol. 2009;16(5):564-71.
54. Wang Y, Leung FC. An evaluation of new criteria for CpG islands in the human genome as gene markers. Bioinformatics. 2004;20(7):1170-77.
55. Kacem S, Feil R. Chromatin mechanisms in genomic imprinting. Mamm Genome. 2009;20(9-10):544-56.
56. Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. Nat Rev Genet. 2008;9(6):465-76.
57. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. Nat Rev Genet. 2007;8:286-98.
58. Robertson KD. DNA methylation and chromatin: unraveling the tangled web. Oncogene. 2002;21(35):5361-79.
59. Esteller M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. Hum Mol Genet. 2007;16(1):R50-59.
60. Chuang LS, Ian HI, Koh TW, Ng HH, Xu G, Li BF. Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. Science. 1997;277(5334):1996-2000.
61. Bostick M, Kim JK, Esteve PO, Clark A, Pradhan S, Jacobsen SE. UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. Science. 2007;317(5845):1760-64.
62. Singal R, Ginder GD. DNA methylation. Blood. 1999;93(12):4059-70.
63. Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N et al. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. Nat Genet. 1998;19(2):187-91.
64. Thomson JP, Skene PJ, Selfridge J, Clouaire T, Guy J, Webb S et al. CpG islands influence chromatin structure via the CpG-binding protein Cfp1. Nature. 2010;464(7291):1082-86.
65. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. Nat Biotechnol. 2010 Oct;28(10):1057-68.
66. Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution. Nature. 1997;389(6648):251-60.
67. Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J et al. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. Cell. 2006;125(2):315-26.
68. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. Science. 2001;293(5532):1074-80.

69. Luco RF, Pan Q, Tominaga K, Blencowe BJ, Pereira-Smith OM, Misteli T. Regulation of alternative splicing by histone modifications. Science. 2010;327(5968):996-1000.
70. Ehrenhofer-Murray AE. Chromatin dynamics at DNA replication, transcription and repair. Eur J Biochem. 2004;271(12):2335-49.
71. Elgin SC, Grewal SI. Heterochromatin: silence is golden. Curr Biol. 2003;13(23):R895-898.
72. Li B, Carey M, Workman JL: The role of chromatin during transcription. Cell, 128(4):707-719, 2007.
73. Haberland M, Montgomery RL, Olson EN. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. Nat Rev Genet. 2009;10(1):32-42.
74. Shi Y. Histone lysine demethylases: emerging roles in development, physiology and disease. Nat Rev Genet. 2007;8(11):829-33.
75. Ringrose L, Paro R. Polycomb/Trithorax response elements and epigenetic memory of cell identity. Development. 2007;134(2):223-32.
76. Tsankova, N., Renthal, W., Kumar, A., & Nestler, E. J. (2007). Epigenetic regulation in psychiatric disorders. Nat Rev Neurosci, 8(5), 355-367.
77. Mills AA. Throwing the cancer switch: reciprocal roles of polycomb and trithorax proteins. Nat Rev Cancer. 2010;10(10):669-82.
78. Griffiths-Jones S. miRBase: miRNA sequences and annotation. Curr Protoc Bioinformatics. 2010;12(19):11-10.
79. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. Cell. 2009;136(2):215-33.
80. Fabian MR, Sonenberg N. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. Nat Struct Mol Biol. 2012;19(6):586-93.
81. Saj A, Lai EC. Control of miRNA biogenesis and transcription by cell signaling pathways. Curr Opin Genet Dev. 2011;21(4):504-10.
82. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. miRNAs as oncogenes and tumor suppressors. Dev Biol. 2007;302(1):1-12.
83. Saito Y, Jones PA. Epigenetic activation of tumor suppressor miRNAs in human cancer cells. Cell Cycle. 2006;5(19):2220-22.
84. Friedman JM, Liang G, Liu CC, Wolff EM, Tsai YC, Ye W et al. The putative tumor suppressor miRNA-101 modulates the cancer epigenome by repressing the polycomb group protein EZH2. Cancer Res. 2009;69(6):2623-29.
85. Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, Liu Z, Zanesi N, Callegari E et al. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104:15805-810.
86. Costa Y, Speed RM, Gautier P, Semple CA, Maratou K, Turner JM et al. Mouse Maelstrom: the link between meiotic silencing of unsynapsed chromatin and miRNA pathway? Hum Mol Genet. 2006;15(15):2324-34.
87. Feil R. Environmental and nutritional effects on the epigenetic regulation of genes. Mutat Res. 2006;600:46-57.
88. Jiménez-Chillarón JC, Díaz R, Martínez D, Pentinat T, Ramón-Krauel M, Ribó S et al. The role of nutrition on epigenetic modifications and their implications on health. Biochimie. 2012;94(11):2242-63.
89. Fenech M, El-Sohemy A, Cahill L, Ferguson LR, French TA, Tai ES et al. Nutrigenetics and nutrigenomics: viewpoints on the current status and applications in nutrition research and practice. J Nutrigenet Nutrigenomics. 2011;4(2):69-89.
90. Camp KM, Trujillo E. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: nutritional genomics. J Acad Nutr Diet. 2014;114(2):299-312.
91. Junien C, Gallou-Kabani C, Vigé A, Gross MS. Nutritional epigenomics of metabolic syndrome. Med Sci. 2005;21(4):396-404.
92. Davis CD, Milner J. Frontiers in nutrigenomics, proteomics, metabolomics and cancer prevention. Mutat Res. 2004;551(1-2):51-64.
93. Oommen AM, Griffin JB, Sarath G, Zempleni J. Roles for nutrients in epigenetic events. J Nutr Biochem. 2005;16(2):74-77.
94. Rush EC, Katre P, Yajnik CS. Vitamin B12: one carbon metabolism, fetal growth and programming for chronic disease. Eur J Clin Nutr. 2014;68:2-7.
95. Anderson OS, Sant KE, Dolinoy DC. Nutrition and epigenetics: an interplay of dietary methyl donors, one-carbon metabolism and DNA methylation. J Nutr Biochem. 2012;23(8):853-59.
96. Kussmann M, Van Bladeren PJ. The extended nutrigenomics: understanding the interplay between the genomes of food, gut microbes, and human host. Front Genet. 2011;20(2):21.
97. Marco A, Kisliouk T, Weller A, Meiri N. High fat diet induces hypermethylation of the hypothalamic Pomc promoter and obesity in post-weaning rats. Psychoneuroendocrinology. 2013;38(12):2844-53.
98. Duthie SJ. Folate and cancer: how DNA damage, repair and methylation impact on colon carcinogenesis. J Inherit Metab Dis. 2011;34(1):101-9.
99. Hu S, Dong TS, Dalal SR, Wu F, Bissonnette M, Kwon JH, et al. The microbe-derived short chain fatty acid butyrate targets miRNA-dependent p21 gene expression in human colon cancer. PLoS One. 2011 Jan 20;6(1):e16221. doi: 10.1371/journal.pone.0016221.
100. Corbin KD, Zeisel SH. Choline metabolism provides novel insights into nonalcoholic fatty liver disease and itsprogression. Curr Opin Gastroenterol. 2012;28(2):159-65.
101. Pan MH, Lai CS, Wu JC, Ho CT. Epigenetic and disease targets by polyphenols. Curr Pharm Des. 2013;19(34):6156-85.
102. Willcox BJ, Willcox DC. Caloric restriction, caloric restriction mimetics, and healthy aging in Okinawa: controversies and clinical implications. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2014;17(1):51-58.
103. Park S, Mori R, Shimokawa I. Do sirtuins promote mammalian longevity? A critical review on its relevance to the longevity effect induced by calorie restriction. Mol Cells. 2013;35(6):474-80.
104. Palacios JA, Herranz D, De Bonis ML, Velasco S, Serrano M, Blasco MA. SIRT1 contributes to telomere maintenance and augments global homologous recombination. J Cell Biol. 2010;191(7):1299-313.
105. Bassett SA, Barnett MP. The role of dietary histone deacetylases (HDACs) inhibitors in health and disease. Nutrients. 2014;6(10):4273-301.
106. Henagan TM, Stefanska B, Fang Z, Navard AM, Ye J, Lenard NR et al. Sodium butyrate epigenetically modulates high fat diet-induced skeletal muscle mitochondrial adaptation, obesity and insulin resistance through nucleosome positioning. Br J Pharmacol. 2015;172(11):2782-98.
107. Nandakumar V, Vaid M, Katiyar SK. (-)-Epigallocatechin-3-gallate reactivates silenced tumor suppressor genes, Cip1/p21 and p16INK4a, by reducing DNA methylation and increasing histones acetylation in human skin cancer cells. Carcinogenesis. 2011;32:537-44.
108. Palmer JD, Soule BP, Simone BA1, Zaorsky NG2, Jin L, Simone NL. MicroRNA expression altered by diet: can food be medicinal? Ageing Res Rev. 2014;16-24.
109.Chartoumpekis DV, Zaravinos A, Ziros PG, Iskrenova RP, Psyrogiannis AI, Kyriazopoulou VE et al. Differential expression of

miRNAs in adipose tissue after long-term high-fat diet-inducedobesity in mice. PLoS One. 2012;7(4):e34872.
110. Kim YJ, Hwang SJ, Bae YC, Jung JS. MiR-21 regulates adipogenic differentiation through adipose tissue. Stem Cells. 2009;27:3093-102.
111. Kim YJ, Hwang SH, Cho HH, Shin KK, Bae YC, Jung JS. MicroRNA 21 regulates the proliferation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and high-fat diet-induced obesity alters miRNA 21 expression in white adipose tissues. J Cell Physiol. 2012;227(1):183-93.
112. Casas-Agustench P, Fernandes FS, Tavares do Carmo MG, Visioli F, Herrera E, Dávalos A. Consumption of distinct dietary lipids during early pregnancy differentially modulates the expression of miRNAs in mothers and offspring. PLoS One. 2015;10(2):e0117858.
113. Davidson LA, Wang N, Shah MS, Lupton JR, Ivanov I, Chapkin RS. n-3 polyunsaturated fatty acids modulate carcinogen-directed non-coding miRNA signatures in rat colon. Carcinogenesis. 2009;30:2077-84.
114. Shah MS, Schwartz SL, Zhao C, Davidson LA, Zhou B, Lupton JR et al. Integrated miRNA and mRNA expression profiling in a rat colon carcinogenesis model: effect of a chemo-protective diet. Physiol Genomics. 2011;43:640-54.
115. Wolter F, Stein J. Resveratrol enhances the differentiation induced by butyrate in caco-2 colon cancer cells. J Nutr. 2002; 132: 2082-86.
116. Milenkovic D, Deval C, Gouranton E, Landrier JF, Scalbert A, Morand C et al. Modulation of miRNA expression by dietary polyphenols in apoE deficient mice: a new mechanism of the action of polyphenols. Plos One. 2012;7(1):e29837.
117. Tryndyak VP, Ross SA, Beland FA, Pogribny IP. Down-regulation of the miRNAs miR-34a, miR-127, and miR-200b in rat liver during hepatocarcino-genesis induced by a methyl-deficient diet. Mol. Carcinog. 2009;48(6):479-87.

Parte 3
Nutrientes, compostos bioativos de alimentos e expressão gênica

Glicose e frutose

6

Renata Juliana da Silva
Tatiane Mieko de Meneses Fujii
Cristiane Cominetti
Maria Aderuza Horst
Marcelo Macedo Rogero

INTRODUÇÃO

O termo "açúcar" deriva do sânscrito *çarkara,* que significa grão de areia. Os açúcares são carboidratos e estruturalmente apresentam carbono, hidrogênio e oxigênio em sua composição, na proporção de 1:2:1.[1] Monossacarídeos e dissacarídeos são classificados como açúcares.[2] A glicose e a frutose são açúcares simples ou monossacarídeos, formados por seis átomos de carbono e, por isso, são também chamadas de hexoses (Figura 6.1).

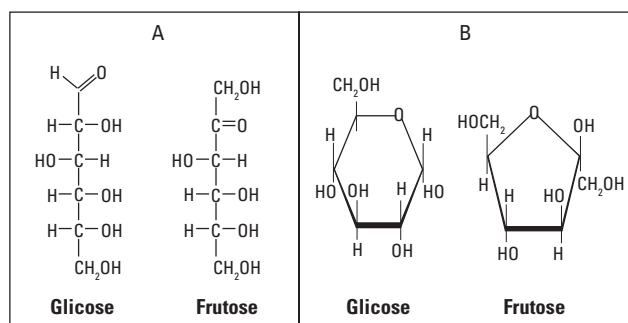



Figura 6.1 (A) Estrutura em cadeia aberta (glicose e frutose). (B) Estrutura em cadeia fechada (glicose e frutose).

Entre os carboidratos classificados como açúcares, também se encontram os dissacarídeos, constituídos por duas moléculas de monossacarídeos, com destaque para a sacarose, composta por 50% de glicose e 50% de frutose. Os alimentos fontes de sacarose podem apresentar composição distinta em relação ao percentual de glicose e frutose, como mostra a Figura 6.2.

Em relação aos efeitos sobre a saúde, é importante destacar dois tipos de açúcares: aqueles naturalmente encontrados nos alimentos – como a frutose e a sacarose,

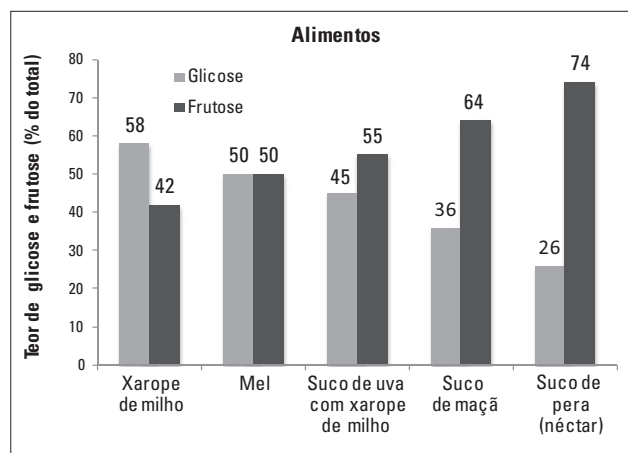



Figura 6.2 Teor de glicose e frutose em alguns alimentos. **Fonte:** adaptada de White.[3]

presentes em frutas e hortaliças, e a lactose presente no leite –, e aqueles extraídos de alimentos (cana-de-açúcar, beterraba e milho) para posterior uso em preparações culinárias ou na elaboração de alimentos processados. A este último grupo de açúcares deu-se o nome de açúcares de adição, termo proposto pelo Departamento de Agricultura Norte-americano em 1996.[4,5] Os açúcares de adição presentes nos alimentos processados (p. ex., refrigerantes, refrescos, sucos prontos, achocolatados, bolos, biscoitos e tortas) podem representar até 70% de sua composição nutricional, sendo utilizados com a alegação de promover maior palatabilidade e preservação dos alimentos.[6] A Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2008-2009[7] mostrou que, no período de cinco anos, o consumo *per capita* de sacarose e de refrigerantes aumentou cerca de 200% e 400%, respectivamente. Outra pesquisa nacional, denominada Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito

Telefônico,[8] observou que, no período de 2006 a 2012, 11,2 a 23,5% dos adultos relataram a ingestão de alimentos doces (sorvetes, chocolates, bolos, biscoitos ou doces) em cinco ou mais dias da semana.

Estudos epidemiológicos evidenciam que a ingestão desses alimentos está associada à prevalência de obesidade, a qual, por sua vez, aumenta o risco do desenvolvimento de distúrbios metabólicos como dislipidemias, diabete melito tipo 2 (DM2), esteatose hepática não alcoólica e doenças renais.[9-11]

A Tabela 6.1 mostra o conteúdo de glicose, frutose e sacarose de alguns alimentos comercializados nos Estados Unidos.

Tabela 6.1 Conteúdo de glicose, frutose e sacarose em alguns alimentos (g por 100 g de alimento)

Alimentos	Glicose	Frutose	Sacarose
Frutas frescas			
Abacaxi	2,9	2,1	3,1
Banana	4,2	2,7	6,5
Cereja	8,1	6,2	0,2
Maçã	2,3	7,6	3,3
Uva	6,5	7,6	0,4
Vegetais frescos			
Cebola	2,4	0,9	1,3
Cenoura	1,0	1,0	3,6
Milho	0,5	0,3	1,5
Tomate	1,1	1,4	0
Leguminosas			
Feijões	1,6	1,4	4,3
Grão-de-bico	0,1	0,1	1,2
Lentilha	0	0,1	0,5
Soja	0,1	0,2	0,5
Doces			
Açúcar mascavo	5,2	0,4	84,3
Mel	33,8	42,4	4,5
Melado de cana	7,4	7,9	26,9
Xarope de bordo	2,3	0,9	59,1
Xarope de milho	14,9	1,2	2,2
Alimentos processados			
Bebida à base de cola*	4,0	4,4	2,1
Bolo de frutas	11,3	11,3	20,5
Caramelo	6,7	5,2	40,9
Farelo de passas	7,3	8,2	10,1
Leite com achocolatado	0,2	0,1	46,8
Licor de cereja	16,5	16,1	0
Pão branco	1,8	1,5	0,1
Suco de laranja	5,3	4,6	0,7

*Bebida comercializada nos Estados Unidos. **Fonte:** adaptada de Hallfrisch.[12]

ASPECTOS BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS DA GLICOSE E DA FRUTOSE

Os monossacarídeos são absorvidos pela membrana apical dos enterócitos por meio de dois mecanismos: transporte ativo e difusão facilitada.[13] Tanto a glicose quanto a galactose são transportadas na membrana apical dos enterócitos contra um gradiente de concentração para o interior citoplasmático das células da mucosa intestinal, por meio da ação de um transportador dependente de sódio (SGLT 1, *sodium-glucose transporter 1*). O sódio é transportado a favor do gradiente de potencial eletroquímico pela membrana apical, uma vez que a luz intestinal é menos negativa que o compartimento intracelular. O gradiente de potencial eletroquímico para o sódio entre a luz intestinal e o meio intracelular é gerado e mantido pela ATPase sódio-potássio (Na^+-K^+) da membrana apical. Assim, uma elevação da concentração de glicose ou galactose no lúmen intestinal acarreta o aumento da absorção de sódio, o que caracteriza esse mecanismo como cotransporte de Na^+/glicose e/ou Na^+/galactose, eletrogênico, com estequiometria de dois íons de sódio por molécula de hexose. Posteriormente, a glicose é então transportada através da membrana basolateral do intestino delgado pelo transportador de glicose 2 (GLUT 2).[14]

No entanto, o transporte de frutose não requer a participação dos SGLT.[15] A molécula de frutose é absorvida por meio de transporte passivo por difusão facilitada pelo GLUT 5, independente de sódio e sem competição com o transporte de glicose/galactose. Além disso, observa-se que a frutose é mais bem absorvida junto de outros açúcares – como ocorre em alimentos que naturalmente contêm frutose – do que quando ela é ingerida isoladamente. De maneira semelhante ao que ocorre com a glicose, a galactose e a frutose também são transportadas através da membrana basolateral por mecanismos de difusão facilitada independente de sódio, por meio do GLUT 2.[14]

Os açúcares absorvidos são transportados pela circulação sanguínea e captados pelas células. Após ser absorvida no lúmen intestinal via GLUT 5 e, posteriormente, ser transportada até o fígado, via veia porta, a entrada da frutose no hepatócito é mediada pelo GLUT 2.[16] No fígado, a frutose é metabolizada (fosforilada no carbono 1) por ação da frutoquinase, transformando-se em frutose-1 fosfato, que é clivada, por meio da ação da aldolase B, em gliceraldeído e di-hidroxicetona fosfato (DHAP), compostos intermediários da via glicolítica.

A captação de glicose pelos adipócitos e miócitos, por exemplo, depende da interação da insulina com seu receptor (IR, *insulin receptor*), que possui duas subunidades alfa e duas subunidades beta, ligadas por pontes dissulfeto. Quando a insulina se liga ao IR na porção extracelular (subunidades alfa), ocorre uma cascata de sinalização iniciada pela ativação da tirosina quinase na porção beta e, assim, há a autofosforilação do receptor. Posteriormente, o substrato do receptor de insulina (IRS, *insulin receptor substrate*) se liga ao IR, sofre fosforilação e amplifica a sinalização da insulina ao ativar a proteína fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), capaz de ocasionar a ativação de uma proteína quinase dependente de fosfoinositol (PDK1), a qual, em seguida, estimula a fosforilação da proteína quinase B (AKT/PKB) para assim promover a translocação de vesículas de GLUT 4 para a superfície das membranas celulares, facilitando a captação de glicose.[17]

Os transportadores de glicose pertencem a uma grande família composta por 13 proteínas já descritas: GLUT 1 a 12 e HMIT (*proton myo-inositol transporter* ou GLUT 13), distribuídas em diferentes tecidos. A Tabela 6.2 mostra as características de alguns transportadores, destacando os valores da constante de Michaelis (K_m), que se refere à velocidade de reação. A K_m faz parte da equação de Michaelis Menten, proposta em 1913 para avaliar a cinética das reações enzimáticas. Assim, quanto menor for esse valor, maior será a afinidade do substrato pela enzima ou proteína correspondente, fato que, neste caso, implicará a eficácia do transporte.[18]

A glicose é o principal combustível utilizado por várias células do corpo. Nos músculos, ela é metabolizada pela via glicolítica em lactato, na ausência de oxigênio, ou em piruvato, na glicólise aeróbia. O piruvato é descarboxilado em acetil-CoA, que entra no ciclo de Krebs. As coenzimas reduzidas geradas pelo ciclo doam seus elétrons para o sistema de transporte de elétrons, formando dióxido de carbono e água, promovendo a síntese de ATP, processo também conhecido como fosforilação oxidativa mitocondrial.[19,20]

Após a captação celular, as moléculas de glicose são convertidas em moléculas de glicose-6 fosfato, podendo ser utilizadas imediatamente ou, ainda, ser armazenadas.[21] O armazenamento de glicose é realizado na forma de glicogênio, composto por várias unidades de glicose, distribuídas linearmente (alfa→1-4) e com a presença de ramificações do tipo alfa→1-6 ao longo da cadeia. Os tecidos responsáveis pelo processo de glicogênese são o músculo esquelético e o fígado, que apresentam, em relação ao peso tecidual, a capacidade de armazenar de 1 a 2% e de 7 a 10% de glicose na forma de glicogênio, respectivamente. Todavia, em razão do tamanho dos tecidos, a disponibilidade de glicogênio muscular (400 g) é superior à hepática (90 a 110 g).[22] A glicogênese é ativada no músculo esquelético quando ocorre elevação das concentrações de insulina em razão da ingestão de carboidratos, e o glicogênio sintetizado é somente utilizado pelo próprio músculo em função da ausência da enzima glicose-6 fosfatase, o que torna irreversível a conversão de glicose-6 fosfato em glicose. De maneira distinta, o fígado é capaz de converter glicose-6 fosfato em glicose livre e, dessa maneira, distribuí-la para tecidos extra-hepáticos.[23]

Tabela 6.2 Características dos transportadores

Proteínas	Genes	K_m (mM)*	Principais locais de expressão
GLUT1	*SLC2A1*	3-7	Eritrócitos e microvasos cerebrais
GLUT2	*SLC2A2*	17	Fígado, células betapancreáticas, rins, intestino delgado
GLUT3	*SLC2A3*	1,4	Cérebro e neurônios
GLUT4	*SLC2A4*	6,6	Músculo esquelético, tecido adiposo e coração
GLUT5	*SLC2A5*	–	Intestino, rins e testículos
GLUT6	*SLC2A6*	–	Pâncreas, leucócitos e cérebro
GLUT7	*SLC2A7*	0,3	Intestino delgado, cólon e testículos
GLUT8	*SLC2A8*	2	Testículos, blastócitos, cérebro, músculo esquelético e adipócitos
GLUT9	*SLC2A9*	–	Fígado e rins
GLUT10	*SLC2A10*	0,3	Fígado e pâncreas
GLUT11	*SLC2A11*	–	Coração e músculo
GLUT12	*SLC2A12*	–	Coração, próstata e glândulas mamárias
HMIT/ GLUT13	*SLC2A13*	–	Cérebro

(–) Sem dados. * Em relação à 2-desoxiglicose ou à glicose. **Fonte:** adaptada de Zhao et al.[18]

A glicose também pode ser sintetizada via gliconeogênese no fígado e no córtex renal, processo que pode ser inibido pelo consumo de carboidratos e ser ativado durante o período de jejum, em que o fígado continua liberando glicose para manter a glicemia.[24]

FRUTOSE E LIPOGÊNESE *DE NOVO*

A lipogênese *de novo* (LDN) é a via metabólica que sintetiza ácidos graxos a partir do excesso de carboidratos. Esses ácidos graxos podem ser incorporados em triacilgliceróis e estocados como reserva energética na célula.[25] A LDN no tecido adiposo é menos responsiva que a LDN hepática em protocolos agudos e crônicos de excesso de ingestão de carboidratos.[26] Além disso, a LDN hepática apresenta contribuição significativa na ocorrência

de hipertriacilglicerolemia em indivíduos que ingerem altas quantidades de carboidratos.[27]

Em comparação à glicose ou ao amido, a frutose é o substrato mais eficaz para a LDN, sendo a hipertriacilglicerolemia de maior magnitude se o conteúdo de carboidratos da alimentação consistir essencialmente em monossacarídeos, com destaque para a frutose.[12,19]

A participação da frutose na LDN hepática inicia-se com a fosforilação desse monossacarídeo pela enzima frutoquinase, o que resulta na produção da frutose 1-fosfato, o substrato da enzima aldolase, que gera DHAP e gliceraldeído. Este último é subsequentemente fosforilado por ação da trioquinase, o que dá origem ao gliceraldeído 3-fosfato (G3P). A DHAP e o G3P podem participar da via glicolítica, sendo convertidos a piruvato, o qual, por sua vez, pode ser convertido em acetil-CoA. No ciclo de Krebs, a acetil-CoA, ao se condensar com o oxaloacetato, forma citrato. O excesso de citrato favorece sua saída da mitocôndria para o citosol, onde, pela ação da enzima citrato liase, é reconvertido em acetil-CoA e oxaloacetato. A enzima acetil-CoA carboxilase catalisa a reação que converte acetil-CoA em malonil-CoA, a qual é utilizada como substrato para a produção do palmitato (ácido graxo de 16 carbonos), por ação da enzima ácido graxo sintase. Além do palmitato, estearato e ácidos graxos de cadeia curta também são produzidos. Posteriormente, ocorre a síntese do triacilglicerol a partir da acil coenzima A gerada. Esta etapa envolve a progressiva acilação do glicerol 3-fosfato pelas enzimas glicerol 3-fosfato acil transferase e lisofosfatidato acil transferase. A desfosforilação do glicerol ocorre por meio da ação da enzima fosfatidato fosfatase, seguida por uma acilação do diacilglicerol em reação catalisada pela diacilglicerol acil transferase. Os triacilgliceróis produzidos podem ser armazenados no fígado ou exportados para outros tecidos associados à lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL, *very low density lipoprotein*).[9,28] Em resumo, a frutose pode fornecer átomos de carbono para a síntese de ácidos graxos e de glicerol, que comporão a molécula de triacilglicerol (Figura 6.3).[29]

Figura 6.3 Metabolismo hepático da frutose: uma via altamente lipogênica. A frutose é prontamente absorvida a partir da alimentação e rapidamente metabolizada, principalmente no fígado. Ela pode fornecer átomos de carbono para o glicerol e para as porções acil do triacilglicerol. É, então, um indutor altamente eficiente da lipogênese *de novo*. Altas concentrações de frutose podem servir como uma fonte relativamente não regulada de acetil-CoA. Ao contrário da glicose, a frutose de origem alimentar não estimula a produção de insulina ou de leptina (importantes reguladoras da ingestão energética e da adiposidade corporal). O estímulo à síntese de triacilglicerol provavelmente promove o acúmulo hepático deste lipídio, o que tem sido relacionado à sensibilidade hepática reduzida da insulina, bem como à formação aumentada de partículas de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) em razão da disponibilidade elevada de substrato, da estabilidade aumentada da apolipoproteína B (APOB) e da maior ação da proteína de transferência microssomal de triacilgliceróis (MTP), o fator crítico na formação da VLDL (DHA-P gera di-hidroxiacetona fosfato). **Fonte:** adaptada de Basciano et al.[29]

A frutose preferencialmente favorece a LDN em comparação com a glicose,[11,23] uma vez que, no fígado, o aumento da atividade de enzimas lipogênicas, como a ácido graxo sintase, resulta em maior síntese de triacilgliceróis e, consequentemente, leva ao aumento da circulação de triacilglicerol associado à VLDL, elevando o risco para o desenvolvimento de dislipidemias.[28]

Em estudo de intervenção, Stanhope et al.[30] mostraram que o consumo de bebidas adoçadas (com frutose ou glicose a 25% do valor energético total), durante dez semanas, entre indivíduos com excesso de peso (IMC entre 25 e 35 kg/m^2) apresentou efeitos distintos. O ganho de peso foi significativo no grupo frutose, ao passo que se observou aumento de 10% nas concentrações de triacilgliceróis no grupo glicose. Os autores também relataram que, mesmo em dietas com distribuição similar de macronutrientes (55% de carboidratos, sendo 25% glicose ou frutose; 30% de lipídios e 15% de proteínas), indivíduos que ingerem bebidas com frutose apresentam maior acúmulo de tecido adiposo visceral (TAV) em relação àqueles que consomem glicose, os quais, por sua vez, apresentam maior acúmulo de tecido adiposo subcutâneo (TAS).

Nesse sentido, considerando a importância da distribuição de tecido adiposo, a maior deposição de TAV com o consumo de frutose sugere associação com o aumento do risco para o desenvolvimento de doenças metabólicas.[31] A Figura 6.4 ilustra o metabolismo hepático da glicose e da frutose após a ingestão de uma bebida rica nesses dois monossacarídeos.

A presença de insulina favorece o aumento da expressão e da atividade da enzima lipase de lipoproteína (LPL), sendo esta mais responsiva no TAS em relação ao TAV. Assim, o aumento das concentrações de insulina em resposta à ingestão de bebidas ricas em glicose leva ao

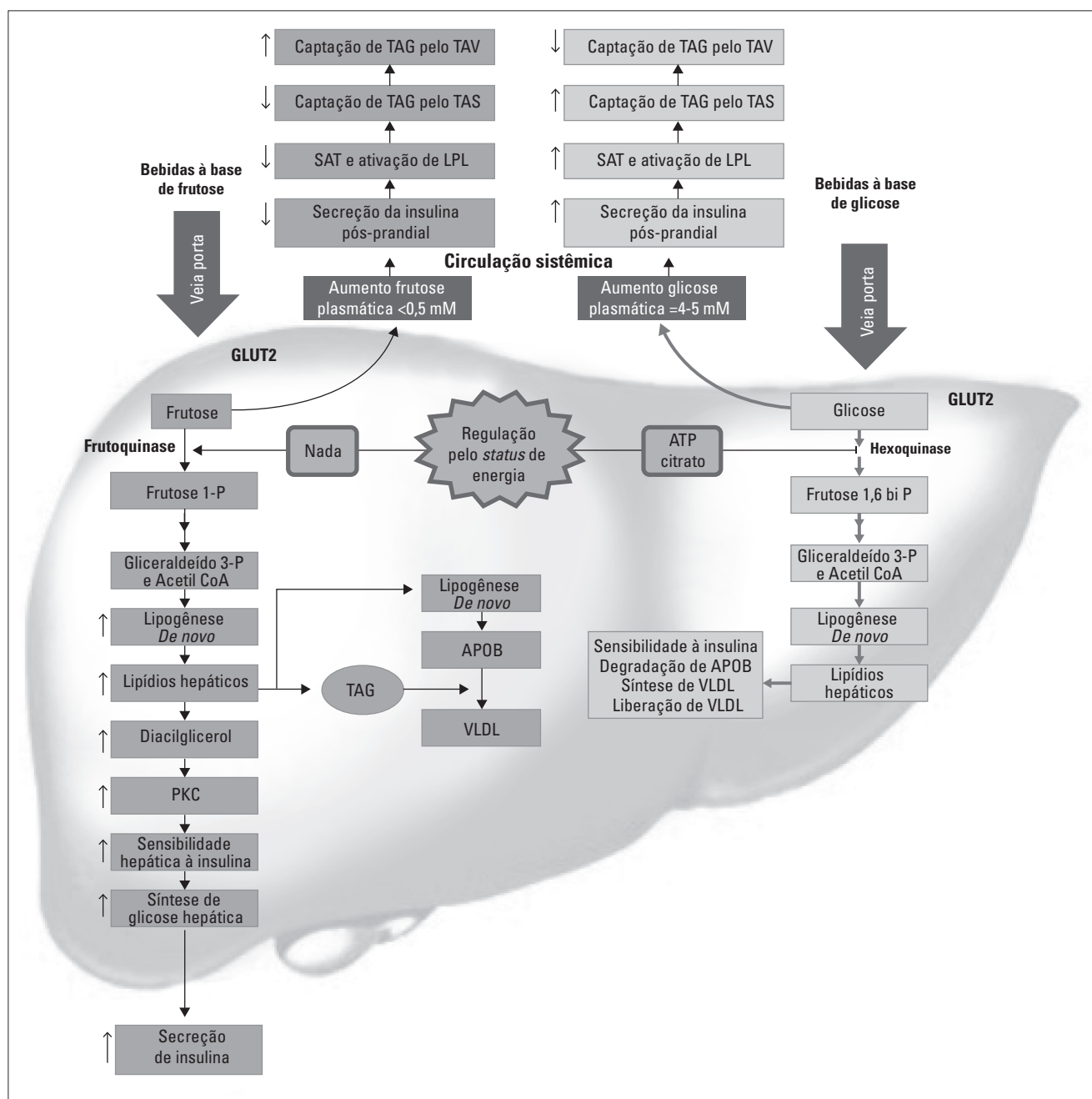



Figura 6.4 Diferentes efeitos do consumo de bebidas adoçadas com frutose e glicose sobre as vias associadas com a deposição de tecido adiposo, metabolismo lipídico pós-prandial, sensibilidade à insulina e tolerância à glicose. APOB: apolipoproteína B; ATP: trifosfato de adenosina; GLUT2: transportador de glicose 2; LPL: lipase de lipoproteína; PKC: proteína quinase C; SAT: ácidos graxos saturados; TAG: triacilgliceróis; TAS: tecido adiposo subcutâneo; TAV: tecido adiposo visceral; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade. **Fonte:** adaptada de Stanhope e Havel.[32]

aumento da atividade da LPL no TAS, colaborando para maior captação de triacilgliceróis por esse tecido. Por outro lado, a frutose não estimula a produção e a secreção de insulina para ser metabolizada e, dessa forma, a ausência da insulina em resposta ao consumo de frutose resulta em maior captação de triacilgliceróis pelo TAV. Tal situação colabora para a síntese de triacilgliceróis no fígado, para a redução da degradação de apolipoproteína B (APOB) e para o aumento da síntese da VLDL rica em triacilgliceróis (VLDL1).[32]

Trabalhos do grupo de Kimber Stanhope[30,32-34] já mostraram os efeitos do consumo de bebidas adoçadas com frutose e/ou glicose sobre o metabolismo de lipídios, a sensibilidade à insulina e o aumento de adiposidade corporal. Além disso, o consumo de frutose – avaliado por questionário de frequência alimentar e calculado pe-

lo consumo de frutose livre mais a porcentagem correspondente de sacarose – foi diretamente associado com o aumento do risco de hiperuricemia, gota e litíase renal, uma vez que o GLUT5 também pode ser expresso nos rins.[35]

ALEGAÇÃO PARA O USO DE FRUTOSE

A ocidentalização da alimentação é um dos fatores da transição nutricional que ocorre em todo o mundo, com aumento na disponibilidade de alimentos de elevado teor calórico e ricos em frutose – como refrigerantes e alimentos pré-preparados – os quais contribuem para a epidemia da síndrome metabólica.[36]

Em 1874, relatou-se pela primeira vez na literatura que, em relação à sacarose ou à glicose, a frutose, por não favorecer o aumento da glicemia e, consequentemente, a síntese e a liberação da insulina, seria mais bem tolerada pelos diabéticos, uma vez que nesses indivíduos a secreção de insulina pode estar prejudicada e, ainda, a captação de glicose pode não ocorrer de forma eficaz. Assim, pensava-se que a utilização de frutose como adoçante ou sua adição em determinados alimentos poderia ser uma opção para substituir a glicose.[37]

Em 1967, a fim de atender ao público diabético, a indústria de alimentos introduziu o uso de xarope de milho como fonte de frutose, principalmente nas bebidas prontas para o consumo, como refrigerantes e certos sucos ou chás, os quais podem apresentar conteúdo de frutose acima de 60%.[37] A Figura 6.5 exemplifica a quantidade de frutose encontrada em algumas bebidas comercializadas nos EUA. Entretanto, com a realização de estudos mais robustos, o consumo excessivo de frutose foi relacionado com o aumento do risco do desenvolvimento de obesidade e DM2.[38]

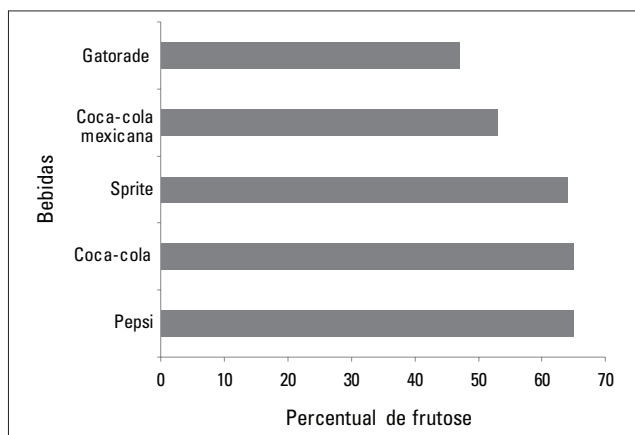



Figura 6.5 Percentual de frutose presente em algumas bebidas adoçadas comercializadas na Califórnia. Teor de frutose avaliado pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). **Fonte:** adaptada de Ventura et al.[39]

Nos Estados Unidos, desde 2006, o consumo de xarope de milho com alto teor de frutose representa o dobro do consumo de sacarose, com médias de ingestão de 100 g/dia e 50 g/dia, respectivamente.[40]

RECOMENDAÇÕES DIETÉTICAS

O aumento da ingestão energética, especialmente de açúcar refinado e de frutose, é nítido e correlaciona-se positivamente com o aumento alarmante da incidência de doenças crônicas não transmissíveis.[29] Há diversos estudos na literatura acerca do consumo elevado de açúcares de adição e de frutose e suas consequências para a saúde.[30,36,40-43]

Os açúcares de adição são aqueles adicionados aos alimentos no momento do seu processamento ou preparação. Na elaboração das ingestões diárias de referência (DRI) de 2002, concluiu-se que não existiam evidências suficientes para estabelecer um nível máximo de ingestão diária para os açúcares de adição, uma vez que não haviam sido verificados efeitos adversos específicos associados com a sua ingestão excessiva. No entanto, sugeriu-se o nível máximo de ingestão diária de 25% em relação ao valor energético total (VET).[44]

A Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2003, preconizou que a ingestão de açúcar não deve exceder 10% do VET, proporção justificada pelas evidências científicas de que a prevalência de cáries dentárias é baixa em países onde o consumo de açúcares não ultrapassa 20 kg *per capita* por ano, o que equivale a 40 a 55 g *per capita*/dia ou 6 a 10% do VET.[45] Em 2015, a OMS lançou o guia *Sugar Intake for Adults and Children*, no qual é confirmada a recomendação de redução de ingestão de açúcar ao longo do ciclo da vida, com sugestão de valores inferiores a 10% em relação à energia total ingerida. Foi feita ainda uma recomendação condicional (grau de evidência mais fraco) de redução da ingestão de açúcares para menos de 5% do VET.[46]

Em 2005, as American Dietary Guidelines recomendaram a diminuição do consumo de açúcar de adição. A American Heart Association publicou as diretrizes para a ingestão de açúcar de adição, recomendando que o consumo seja limitado a 100 e 150 kcal/dia para homens e mulheres, respectivamente. A razão dessa restrição consiste na prevenção do ganho de peso, de cáries dentárias e de deficiências nutricionais.[47]

No *Guia Alimentar para a População Brasileira* elaborado pelo Ministério da Saúde, a recomendação do consumo de açúcares é de 10% em relação ao VET da alimentação. Na primeira versão, é estipulado o consumo diário máximo de uma porção de doces e açúcares. Já a segunda versão ressalta a importância da redução do

açúcar de adição em toda e qualquer preparação culinária, bem como a redução do consumo de alimentos processados e ultraprocessados.[48]

No entanto, deve-se ressaltar que, até o momento, não foi preconizada nenhuma recomendação de ingestão específica para a frutose e que o seu consumo proveniente de vegetais, como frutas e hortaliças, não deve ser desencorajado, pois sua ingestão é considerada segura e saudável. Segundo as Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes,[49] a adição de frutose na alimentação de indivíduos diabéticos não é recomendada.

Os efeitos do consumo em excesso de açúcares em humanos podem ser observados na Tabela 6.3.

INTERAÇÃO GENES-NUTRIENTES

Distúrbios metabólicos e polimorfismos genéticos relacionados ao metabolismo da frutose, ao diabete e à síndrome metabólica

Polimorfismos genéticos podem estar associados a diferenças nas respostas metabólicas individuais. Na prática clínica, a frutose está relacionada a alguns erros inatos do metabolismo, os quais têm baixa incidência e os sintomas, quando presentes, são inespecíficos. Os sintomas mais clássicos associados a esses distúrbios são hipoglicemia e acidose metabólica.[1]

Tabela 6.3 Síntese de alguns estudos sobre os efeitos do consumo de açúcares em humanos

População	Características do estudo	Resultados principais	Referências
18 pacientes obesos com EHNA (5 homens e 13 mulheres), com idade média de 45 anos	Estudo de intervenção com dois grupos: (i) restrição de carboidratos (inferior a 20 g/dia) *versus* (ii) restrição calórica	Redução do peso corporal semelhante (–4,6 ± 1,5 kg *versus* –4,0 ± 1,5 kg) Redução significativa de depósito de TAG hepáticos para o grupo (i) em relação ao (ii) (–55% ± 14% *versus* –28% ± 23%)	Browning et al. (2011)[50]
Adultos saudáveis (12 homens e 8 mulheres), com idade média de 30 anos	Estudo de intervenção denominado Tufrog (*TUebingen Fructose Or Glucose*). Ingestão de 150 g de frutose (n=10) ou de glicose (n=10) por 4 semanas. Dietas isocalóricas	Em ambos os grupos observou-se aumento do depósito de lipídios no TAV e no fígado	Silbernagel et al. (2011)[51]
40.389 homens saudáveis	Estudo prospectivo de coorte com acompanhamento de 20 anos. Avaliação do consumo de bebidas adoçadas	Após ajuste pela idade, foi encontrada razão de risco para DM2 1,91 vez maior associada ao consumo das bebidas adoçadas (2.680 casos)	De Koning et al. (2011)[52]
559 adolescentes entre 14 e 18 anos	Estudo de associação entre o consumo de frutose e fatores de risco cardiometabólicos	O consumo de frutose foi associado com aumento da PAS, da glicemia de jejum, do índice HOMA-IR e da concentração de proteína C reativa, bem como com redução da concentração plasmática de HDL e de adiponectina	Pollock et al. (2012)[53]
Adultos com excesso de peso (16 homens e 15 mulheres), com idade entre 40 e 72 anos	Estudo de intervenção durante 10 semanas com ingestão de bebidas adoçadas (25% do valor calórico total)	Indivíduos que consumiram frutose apresentaram aumento das concentrações plasmáticas de MCP-1, de PAI-1 e de E-selectina quando comparados àqueles que receberam somente glicose	Cox et al. (2011)[54]
61.226 mulheres, com idade média de 53 anos	Estudo de coorte com acompanhamento de 18 anos e 4 meses. Avaliação dos efeitos do consumo de sacarose e alimentos ricos em açúcar	O consumo de roscas doces e *cookies* foi associado com aumento do risco de câncer de endométrio	Friberg et al. (2011)[55]

EHNA: esteatose hepática não alcoólica; HDL: lipoproteína de alta densidade; HOMA-IR: *homeostatic model assessment of insulin resistance*; MCP-1: proteína quimiotática para monócitos 1; PAI-1: inibidor do ativador de plasminogênio 1; PAS: pressão arterial sistêmica; TAG: triacilgliceróis; TAV: tecido adiposo visceral.

Em função de alterações genéticas, podem existir várias anormalidades na absorção e no metabolismo da frutose. Estima-se que um em cada três adultos e duas em cada três crianças apresentem problemas de má absorção de frutose, sofrendo vários efeitos adversos gastrintestinais, como inchaço e diarreia.[56,57]

A homeostase glicêmica está diretamente relacionada ao equilíbrio controlado do fluxo de glicose nos dife-

rentes tecidos corporais. Genes da superfamília SLC (carreador de soluto) codificam diferentes isoformas de proteínas transportadoras de glicose/frutose, as quais se expressam de maneira tecido-específica, de acordo com o padrão de ativação de fatores de transcrição que regulam a atividade desses genes em cada tipo celular.[58]

Variações no gene *SLC2A5* (carreador de soluto família 2, membro 5), que codifica o principal transportador de frutose intestinal, o GLUT5, podem ser responsáveis pela má absorção de frutose. Já mutações no gene *SLC2A2* (carreador de soluto família 2, membro 2), o qual codifica o GLUT2, e nos genes que codificam as enzimas frutoquinase e sacarose isomerase, podem causar doenças hereditárias raras nos seres humanos.[58] Mutações no gene *SLC2A2* podem ocasionar a utilização inadequada de glicose e galactose, resultando em acúmulo de glicogênio hepático e em disfunção renal.[59]

Estudos de associação ampla do genoma (GWAS) identificaram cinco genes principais relacionados ao metabolismo da frutose, os quais são selecionados com base na sua capacidade de regular as concentrações de frutose no organismo. De acordo com suas funções principais, eles são classificados em:

- Genes que codificam proteínas envolvidas na absorção/transporte intestinal/hepático de frutose: *SI* (sacarase-isomaltase), *SLC2A2* e *SLC2A5*. Polimorfismos nesses genes podem influenciar a absorção de frutose da alimentação e alterar significativamente sua biodisponibilidade.
- Genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo da frutose: *KHK* (frutoquinase) e *ALDOB* (aldolase B ou frutose 1,6-bifosfato).

Polimorfismos nesses genes podem modificar o metabolismo e, consequentemente, influenciar a concentração e o grau de exposição do indivíduo a subprodutos metabólicos derivados da clivagem da frutose, o que está relacionado com o desenvolvimento de doenças metabólicas (Tabela 6.4).[60]

Polimorfismos nesses cinco genes podem conferir risco individual variável para o desenvolvimento de fenótipos metabólicos adversos, como concentrações séricas elevadas de ácido úrico e de triacilgliceróis, o que, em última instância, pode levar ao desenvolvimento de doenças renais e cardiovasculares.[61]

Um estudo exploratório foi conduzido para elucidar o impacto dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) nos genes *KHK*, *SLC2A2 e SLC2A5* sobre o aumento da suscetibilidade de desenvolver fenótipos metabólicos adversos. Foram utilizados dados de populações que participaram dos estudos *Pharmacogenomic Evaluation and Antihypertensive Responses* (Pear) e *Genetic Epidemiology of Responses to Antihypertensives* (Gera) I e II.[61] Em conclusão, esse estudo detectou algumas associações potencialmente interessantes entre polimorfismos nos genes *KHK*, *SLC2A2* e *SLC2A5* e componentes da síndrome metabólica nas populações estudadas. Os dados sugerem que variações nesses genes, especialmente no *SLC2A2*, podem ter papel importante no aumento do risco de o indivíduo desenvolver fenótipos metabólicos desfavoráveis, como doenças cardiovasculares, dislipidemias e DM2.[61]

Ainda, o gene do transportador de frutose ou GLUT9, denominado *SLC2A9*, é expresso nos túbulos renais e pode modular a excreção de ácido úrico.[62,63] O SNP

Tabela 6.4 Genes relacionados ao metabolismo da frutose

Gene	Localização cromossômica	Tamanho em pb	Nome	Nome alternativo	Proteína (número de aminoácidos)
ALDOB	9q21.3q22.2	14.448	Aldolase B ou frutose 1,6-bifosfato	–	364
KHK	2p23.3	14.009	Frutoquinase ou ceto-hexoquinase	–	299
SI	3q25.2-q26.2	99.597	Sacarase-isomaltase ou alfa-glicosidase	–	1.827
SLC2A2	3q26.1-q26.2	30.632	Carreador de soluto família 2, membro 2 (facilitador do transporte de glicose)	GLUT2	524
SLC2A5	1p36.2	32.664	Transportador de soluto família 2, membro 5 (facilitador do transporte de glicose/frutose)	GLUT5	501

Fonte: National Center for Biotechnology Information (disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene; acessado em: 27 jul. 2016) e University of California, Santa Cruz Genome Bioinformatics (disponível em: http://genome.ucsc.edu/; acessado em: 27 jul. 2016), NCBI Build 36.1.

rs11942223 nesse gene pode ser o responsável por diferenças nas concentrações plasmáticas de ácido úrico que variam de 1 a 2% nos homens e 5 a 6% nas mulheres.[64] Um GWAS identificou outros três SNP no gene *SLC2A9* (rs6832439, rs13131257, rs737267) relacionados com as concentrações plasmáticas de ácido úrico na população mexicana-americana.[65]

ERROS INATOS DO METABOLISMO DA FRUTOSE

Os erros inatos ligados ao metabolismo da frutose incluem frutosúria essencial, intolerância hereditária à frutose e deficiência da frutose-1,6 bisfosfatase, que serão abordados a seguir.

Frutosúria essencial

A frutosúria essencial é um distúrbio metabólico assintomático, causado pela deficiência da enzima frutoquinase, o que promove a diminuição da conversão de frutose em frutose-1 fosfato. Consequentemente, a frutose é parcialmente metabolizada por meio da conversão em frutose-6 fosfato e parcialmente excretada pela urina.[56] Tal transtorno foi descrito de forma independente e simultânea por dois pesquisadores, Czapek e Zimmer, em 1876. Predominantemente, acomete indivíduos de origem judaica, sendo sua incidência de 1:120.000.[66]

O gene da frutoquinase (*KHK*) tem localização cromossômica 2p23.3-23.2. O *splicing* alternativo resulta em duas isoformas da enzima: a frutoquinase A, expressa em tecido humano fetal e adulto, mas que ainda não tem sua ação fisiológica bem compreendida; e a frutoquinase C, expressa no fígado, nos rins e no intestino delgado, cujas alterações resultam em frutosúria essencial.[67]

Até o momento, são conhecidas cerca de 430 variações (entre SNP e mutações) no gene da frutoquinase.[68] Destas, as únicas mutações causadoras da frutosúria essencial relatadas até 2012 resultam nas substituições Gly40Arg e Ala43Thr.[69,70]

A frutosúria essencial resulta em hiperfrutosemia de origem alimentar, sem disfunção clínica, mas que pode produzir um teste de diabete falso-positivo. Aproximadamente uma em cada 130.000 pessoas na população apresenta essa alteração. Entretanto, a frutosúria não requer tratamento alimentar específico.

Intolerância hereditária à frutose

Chambers e Pratt,[71] em 1956, relataram o primeiro caso de intolerância hereditária à frutose, inicialmente denominada *idiossincrasia à frutose*, em uma jovem de 24 anos de idade. O principal sintoma relatado foi vômito intenso após ingestão de frutas. No entanto, seu reconhecimento como erro inato do metabolismo foi realizado por Froesch et al.[66] em 1976, que descobriram que a administração de frutose em indivíduos afetados provocava hipoglicemia grave.

A intolerância hereditária à frutose tem como defeito enzimático primário a ausência da enzima aldolase B, responsável pela clivagem da frutose-1 fosfato, cuja reação gera DHAP e gliceraldeído. Todos os sinais e sintomas presentes na intolerância hereditária à frutose são decorrentes do acúmulo da frutose-1 fosfato, da redução da concentração intracelular de fósforo inorgânico, da alteração no potencial de fosfato e das inibições enzimáticas secundárias ao acúmulo de frutose-1 fosfato, as quais provocam hipoglicemia por inibição da glicogenólise e gliconeogênese. Consequentemente, há aumento da concentração de frutose no sangue e eliminação desse monossacarídeo pela urina.[1]

Três genes diferentes que codificam as aldolases foram identificados. Enquanto as isozimas A e C são principalmente expressas no músculo e no cérebro, respectivamente, a aldolase B é a principal enzima do fígado, do córtex renal e do intestino delgado. O gene humano da aldolase B (*ALDOB*) foi mapeado na região cromossômica 9q22.3. Atualmente, de acordo com o banco de dados GeneCards, cerca de 464 variações do gene *ALDOB* já foram relatadas. Entre elas, 14 mutações são relacionadas ao desenvolvimento da intolerância hereditária à frutose, sendo mais comuns (84%) a A149P (norte da Europa), a A174D (centro e sul da Europa) e a N334K (Leste Europeu), além das mutações A150P, A175D e N335K, relativamente comuns em indivíduos da Europa Central, sendo observadas frequências de 65%, 11% e 8% de alelos variantes, respectivamente.[66,72]

A incidência da intolerância hereditária à frutose é de cerca de 1:40.000, sendo igual em ambos os sexos e com apresentação clínica variável. Enquanto alguns pacientes são extremamente sensíveis à frutose, outros podem tolerar quantidades moderadas. A atividade da aldolase B pode variar de indetectável até 15 a 30% do normal.[73]

Todos os sinais e sintomas apresentados na frutosemia são decorrentes do acúmulo da frutose-1 fosfato, da diminuição da concentração de fósforo inorgânico intracelular, do desarranjo no potencial de fosfato e das inibições enzimáticas secundárias ao acúmulo de frutose-1 fosfato, em função da inibição da fosforilação da frutose pela frutoquinase.[1] Os bloqueios enzimáticos envolvendo a fosforilase e a frutose-1,6 bisfosfatase explicam o aparecimento da hipoglicemia persistente. Já outros sintomas, como náuseas e vômitos, são explicados pelo acúmulo de frutose-1 fosfato e pelo desarranjo do metabolismo do fosfato e de energia na mucosa intestinal. As alterações

que promovem acúmulo de frutose-1 fosfato e alteração do metabolismo de fosfato nos rins acarretam perda da capacidade de acidificação urinária e da reabsorção tubular de fosfato.[66]

O diagnóstico inclui a pesquisa de frutose na urina e, a dosagem de fosfato inorgânico sérico e de glicose sanguínea após a ingestão de substâncias contendo frutose. O teste de tolerância à frutose pode ser realizado por meio da infusão intravenosa de frutose, que provocará hipoglicemia, queda acentuada e prolongada na concentração plasmática de fosfato e alterações urinárias, como aumento do pH e excreção de fosfato. Essas alterações são reversíveis após o teste. A etapa seguinte da investigação diagnóstica envolve a biópsia hepática para a determinação da atividade da aldolase B.[1]

O tratamento da intolerância hereditária à frutose consiste na exclusão da frutose da alimentação.[72] Caso o consumo de fontes de frutose persista, ocorrem episódios de hipoglicemia e insuficiência renal e hepática, podendo levar o paciente à morte.[74]

Deficiência da frutose-1,6 bisfosfatase

Em 1970, Baker e Winegrad[75] identificaram, pela primeira vez, a deficiência de frutose-1,6 bisfosfatase (FBPase) em uma menina de cinco anos de idade, com episódios repetidos de acidose metabólica e hipoglicemia desde os seis meses de vida. Trata-se de doença de herança genética autossômica recessiva, que atinge mais meninas que meninos (1,5:1). O transtorno básico é a deficiência da enzima frutose-1,6 bisfosfatase; o fígado só consegue produzir glicose a partir do glicogênio enquanto perdurarem suas reservas. A frutose-1,6 bisfosfatase é necessária para a condensação das trioses em frutose-1,6 bisfosfato e, portanto, impede a formação de glicose a partir de outras fontes que não a glicose.[73] A incidência da deficiência da frutose-1,6 bisfosfatase parece ser muito mais baixa que a da intolerância hereditária à frutose. Além de europeus e norte-americanos, muitos casos foram diagnosticados no Japão.[76]

Em cerca da metade de todos os casos, a deficiência de frutose-1,6 bisfosfatase apresenta-se nos primeiros 4 dias de vida com sintomas de hiperventilação grave, causada por profunda acidose (acumulo de ácido láctico) e hipoglicemia significativa.[71] Existem evidências da existência de mais de uma isoforma da frutose-1,6 bisfosfatase com atividade em seres humanos. A isoforma muscular tem diferentes características cinéticas em relação à isoforma encontrada no fígado e não é alterada em pacientes com deficiência da frutose-1,6 bisfosfatase.[71] O gene da frutose-1,6 bisfosfatase isoforma 1 (*FBP1*), a qual é expressa no fígado, está localizado na região cromossômica 9q22.2-q22.3. Cerca de 953 variações genéticas estão relacionadas a esse gene, sendo quatro delas envolvidas no desenvolvimento da deficiência de frutose-1,6 bisfosfatase, a saber: P284R (Pro284Arg), A177D (Ala177Asp), G164S (Gly164Ser) e F194S (Phe194Ser).[68]

Portadores da deficiência de frutose-1,6 bisfosfatase apresentam graves episódios de hipoglicemia e acidose metabólica no período neonatal ou nos primeiros meses de vida. Esses episódios são desencadeados pelo jejum prolongado ou por infecções febris e são acompanhados por anorexia e vômitos. Contrariamente aos pacientes com intolerância hereditária à frutose, esses indivíduos toleram quantidades normais de frutose e sacarose provenientes da alimentação, não desenvolvendo aversão aos alimentos doces.[1]

Apesar de não ser necessário eliminar a frutose e a sacarose da alimentação, a redução desses componentes é recomendada até o estabelecimento do limiar de sensibilidade, que é particular para cada paciente. O álcool apresenta poder inibitório da gliconeogênese e, dessa forma, deve ser restringido. Após o diagnóstico da deficiência da frutose-1,6 bisfosfatase e o tratamento adequado ser instituído, o prognóstico geralmente é bom. O crescimento e o desenvolvimento são normais e a tolerância ao jejum melhora com o avanço da idade.[73]

FRUTOSE: EXPRESSÃO GÊNICA E SÍNDROME METABÓLICA

O fígado é um órgão essencial para a manutenção da homeostase lipídica, glicídica e hormonal. Desde a identificação da proteína de ligação ao elemento regulador dos esteroides (SREBP, *sterol regulatory element-binding protein*) como fator de transcrição que modula a homeostase lipídica, tem-se dado grande atenção ao papel do gene que codifica essa proteína na regulação intracelular da LDN. A frutose tem a capacidade de, direta ou indiretamente, por meio dos seus intermediários metabólicos no metabolismo hepático, ativar fatores de transcrição como a proteína 1c de ligação ao elemento regulador dos esteroides (SREBP1c, *sterol regulatory element-binding protein-1c*) e a proteína de ligação ao elemento de resposta aos carboidratos (ChREBP, *carbohydrate responsive element-binding protein*), de forma independente de insulina. Ambos os fatores de transcrição são responsáveis pela ativação de genes que codificam enzimas envolvidas na LDN, contribuindo, dessa forma, para a síntese de lipídios e, por consequência, com a gênese da síndrome metabólica.[77]

Evidências mostram que coativadores de fatores de transcrição da família PGC-1 (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1*) controlam a ex-

pressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico e glicídico hepático. Embora inicialmente descrito como um coativador do PPAR-gama,[78] o PGC-1 é reconhecido como coativador de múltiplos fatores de transcrição. Ele pode coordenar tanto o metabolismo glicídico hepático, via FOXO1 (*forkhead box protein O1*),[79] HNF4-alfa (*hepatocyte nuclear factor 4 alpha*)[80] e MEF-2 (*muscle-selective transcription factor-2*),[81] como o metabolismo lipídico hepático, via PPAR-alfa,[82] LXR (*liver X receptor*)[83] e SREBP.[83] O PGC-1 beta ativa a expressão de genes envolvidos na lipogênese e na secreção de triacilgliceróis via SREBP, o que não ocorre via PGC-1 alfa.[83] Assim, o PGC-1 beta é um regulador conhecido do metabolismo lipídico e glicídico no fígado e desempenha função prioritária na lipogênese induzida pelo consumo de frutose, uma vez que esse monossacarídeo pode ativá-lo e, por consequência, regular a expressão de genes lipogênicos e inibir a oxidação de ácidos graxos no fígado, o que contribui para a LDN.[84,85]

Em relação ao desenvolvimento de dislipidemias, estudos *in vivo* com hamsters demonstraram que o consumo de ração rica em frutose estimula a produção de FOXO1 e promove a sua redistribuição nuclear no fígado.[86] Essa proteína, por sua vez, aumenta a produção de Apo CIII e prejudica a hidrólise de triacilgliceróis. Sugere-se que esse seja um possível mecanismo para o metabolismo hepático de gorduras em resposta a uma alimentação rica em frutose. Ainda, o aumento da síntese de FOXO1 estimula a gliconeogênese e a hiperglicemia.[77]

Ademais, estudos têm mostrado também que a alimentação rica em frutose é capaz de promover a ativação da expressão do fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), contribuindo com a resposta inflamatória. A ativação de vias inflamatórias pela alimentação rica em frutose pode ter influência direta sobre a secreção hepática e intestinal de lipoproteínas. Vias inflamatórias clássicas, como a do fator nuclear kappa B (NF-kB), são estimuladas por altas concentrações de frutose[86] e contribuem para a síntese hepática de triacilgliceróis elevada e, em consequência, para o desenvolvimento da obesidade, como também de DM2.[88]

Com relação ao desenvolvimento da obesidade em função do consumo de frutose, estudos têm sugerido que a alimentação rica em frutose pode promover resistência central à leptina, o que modula as respostas de fome e saciedade e contribui para o ganho de peso exacerbado.[89]

Todas essas evidências científicas dão ênfase aos vários mecanismos moleculares emergentes, nos quais vias bioquímicas e de expressão gênica são estimuladas em função da exposição à frutose, contribuindo para o desenvolvimento da síndrome metabólica. A Figura 6.6 esquematiza os mecanismos e os fatores envolvidos no desenvolvimento da síndrome metabólica relacionados à frutose.

Nagai et al.[85] avaliaram a função do PGC-1 beta na patogênese da resistência à insulina induzida pela frutose em ratos submetidos à administração de RNA antissenso (ASO) da PGC-1 beta, o que silencia tal gene no fígado e no tecido adiposo. Os animais foram alimentados com ração rica em frutose, sendo 60% do VET da dieta proveniente de carboidratos e 66,8% do total de carboidratos oriundo da frutose. Os autores demonstraram que o ASO PGC-1 beta melhorou o fenótipo metabólico induzido pela alimentação rica em frutose, reduzindo a expressão da SREBP-1, como também diminuiu a transcrição de genes alvos do LXR (*SCARB1, ABCG8*) no fígado. Ademais, o ASO PGC-1 beta reverteu a resistência hepática à insulina induzida pela frutose, além de aumentar a disponibilidade de glicose, estimulada pela insulina, conforme evidenciado pelo aumento de três vezes na captação de glicose no tecido adiposo branco.

A SREBP-1c também tem sido relacionada à regulação da resistência à insulina humana. Maudes et al.[90] identificaram duas mutações (P87L e P416A) em éxons que codificam o domínio de ativação transcricional amino terminal, encontrando correlação com resistência à insulina. Além disso, dados do estudo de coorte *Cambridgeshire Case Control Population* identificaram associação significativa do SNP (C/T) entre os éxons 18c e 19c e o desenvolvimento de diabete em homens, mas não em mulheres.

A ativação do gene que codifica a SREBP-1c parece ser suscetível à alimentação, o que torna esse gene um candidato para intervenções nutricionais. Examinando duas linhagens de camundongos (CBA/JN e DBA/2N), Nagata et al.[91] descobriram que a expressão hepática do gene da SREBP-1c diferiu entre os modelos após o consumo de ração com alto teor de frutose (67% do valor energético total da ração proveniente de carboidratos e 98% do total de carboidratos oriundos da frutose), durante 8 semanas. A expressão gênica da SREBP-1c hepática foi significativamente aumentada pela ingestão da ração com alto teor de frutose em camundongos CBA/JN, enquanto nenhuma resposta foi observada em animais do grupo DBA/2N. Comparando as sequências de nucleotídeos entre as duas linhagens de camundongos, os pesquisadores verificaram a presença de um SNP (–468 A/G; adenina no grupo DBA/2N e guanina no grupo CBA/JN) na região promotora do gene da SREBP-1c. Além disso, o grupo DBA/2N apresentou redução da estimulação da atividade do promotor induzida pela insulina.

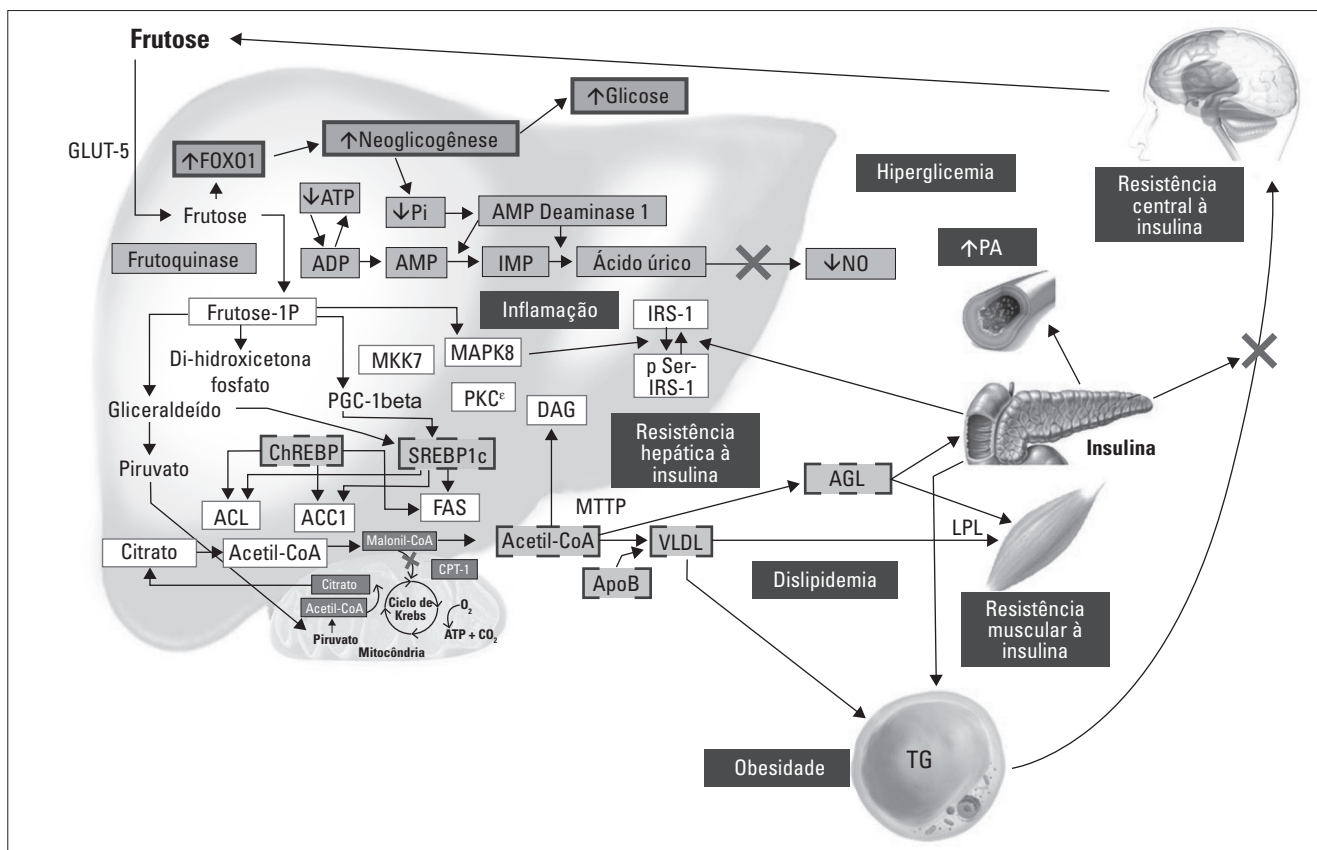



Figura 6.6 Mecanismos propostos para a indução da síndrome metabólica pela frutose. ACC1: acetil-CoA carboxilase 1; acetil-CoA: acetilcoenzima A; ACL: ATP citrato liase; ADP: difosfato de adenosina; AGL: ácidos graxos livres; AMP: monofosfato de adenosina; ApoB: apolipoproteína B; ATP: trifosfato de adenosina; ChREBP: proteína de ligação ao elemento de resposta aos carboidratos; CPT-1: carnitina palmitoil-transferase 1; DAG: diacilglicerol; FAS: ácido graxo sintase; FOXO1: *forkhead box protein O1*; Frutose-1P: frutose-1 fosfato; GLUT-5: transportador de glicose 5; IMP, monofosfato de inosina; IRS-1: substrato 1 do receptor da insulina; LPL, lipase das lipoproteínas; malonil-CoA: malonil-coenzima A; MAPK8: quinase 8 de proteínas ativadas por agentes mitogênicos; MKK7: quinase 7 ativadora de proteínas da família da MAPK; MTTP: proteína microssomal de transferência de triacilgliceróis; NO: óxido nítrico; PA: pressão arterial; PGC-1 beta: coativador 1 beta do receptor ativado por proliferador de peroxissomos; Pi: fosfato inorgânico; PKCε: proteína quinase C tipo ε; pSer-IRS-1: IRS-1 fosforilado em serina; SREBP1c: proteína 1c de ligação ao elemento regulador dos esteroides; TG: triacilglicerol; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade. **Fonte:** adaptada de Lim et al.[77]

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A glicose e a frutose são essenciais ao metabolismo energético humano; entretanto, o consumo em excesso está relacionado a alterações na homeostase metabólica e, consequentemente, ao surgimento de doenças crônicas não transmissíveis. Na década de 1970, estudos apontaram que a frutose poderia ser um substituto seguro do açúcar simples para pacientes com DM2. Essa constatação deu origem a produtos como o xarope de milho, com alto teor de frutose, o qual começou a ser utilizado indiscriminadamente na fabricação de bebidas. Estudos epidemiológicos indicam que o aumento do consumo de bebidas ricas em frutose é um dos responsáveis pelo aumento da incidência de obesidade e DM2.[5,33,38] No entanto, não há nenhuma evidência concreta de que o consumo moderado de frutas resulte em alterações metabólicas.

Erros inatos do metabolismo relacionados ao metabolismo da glicose e da frutose são decorrentes de mutações genéticas já identificadas. Entretanto, as ações deletérias do consumo excessivo crônico de glicose e frutose estão relacionadas a alterações metabólicas resultantes de distúrbios em vias de sinalização celular, as quais ocasionam alteração da expressão de genes envolvidos com o metabolismo de lipídios e de carboidratos. Ainda, GWAS identificaram variações genéticas relacionadas ao aumento da suscetibilidade individual para o desenvolvimento de DM2. Alguns genes alvo já foram identificados e podem direcionar pesquisas que visam à redução do risco do desenvolvimento de doenças metabólicas. Entretanto, ainda há muito a ser esclarecido sobre a relação

frutose/glicose-genes-homeostase metabólica, e estudos de genômica nutricional serão fundamentais para a reversão do cenário epidemiológico atual.

REFERÊNCIAS

1. Barreiros RC et al. Frutose em humanos: efeitos metabólicos, utilização clínica e erros inatos associados. Rev. Nutr. 2005;18(3):337-89.
2. Cummings JH, Stephen AM. Carbohydrate terminology and classification. Eur J Clin Nutr. 2007;61(Suppl 1):S5-18. Review.
3. White JS. Challenging the fructose hypothesis: new perspectives on fructose consumption and metabolism. Adv Nutr. 2013;4(2):246-56.
4. Levy RB, Claro RM, Bandoni DH, Mondini L, Monteiro CA. Disponibilidade de "açúcares de adição" no Brasil: distribuição, fontes alimentares e tendência temporal. Rev Bras Epidemiol. 2012;15(1):3-12.
5. Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. Am J Clin Nutr. 2004;79(4):537-43. Review.
6. FAO 1998. Carbohydrates in human nutrition. Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome. Report of a Joint FAO/ WHO Expert Consultation. FAO Food and Nutrition.
7. IBGE. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009. Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil. Rio de Janeiro; 2010.
8. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigitel Brasil 2013: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde; 2014.
9. Basaranoglu M, Basaranoglu G, Sabuncu T, Sentürk H. Fructose as a key player in the development of fatty liver disease. World J Gastroenterol. 2013;19(8):1166-72.
10. Flynn ER, Alexander BT, Lee J, Hutchens ZM Jr, Maric-Bilkan C. High-fat/fructose feeding during prenatal and postnatal development in female rats increases susceptibility to renal and metabolic injury later in life. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2013;304(4):R278-85.
11. Goran MI, Dumke K, Bouret SG, Kayser B, Walker RW, Blumberg B. The obesogenic effect of high fructose exposure during early development. Nat Rev Endocrinol. 2013;9(8):494-500.
12. Hallfrisch J. Metabolic effects of dietary fructose. FASEB J. 1990;4(9):2652-60. Review.
13. Johnson LR. Digestion and absorption. In Johnson LR. Gastrointestinal physiology. 6.ed. St. Louis: A Harcourt Health Sciences Company; 2001.
14. Keim NL, Levin RJ, Havel PJ. Carbohydrates. In: Ross AC et al. Modern nutrition in health and disease. 11.ed. Wolters Kluwer: Williams and Wilkins; 2014.
15. Díez-Sampedro A, Eskandari S, Wright EM, Hirayama BA. Na+-to-sugar stoichiometry of SGLT3. Am J Physiol Renal Physiol. 2001;280:F278–F282.
16. Shi X, Schecll HP, Summers RM, Lambert GP, Chang RT, Xia T et al. Fructose transport mechanism in humans. Gastroenterology. 1997;113(4):1171-79.
17. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. Nat Rev Mol Cell Biol. 2006;7(2):85-96.
18. Zhao FQ, Keating AF. Functional properties and genomics of glucose transporters. Curr Genomics. 2007;8(2):113-28.
19. Parks EJ, Hellerstein MK. Carbohydrate-induced hypertriacylglycerolemia: Historical perspective and review of biological mechanisms. Am J Clin Nutr. 2000;71:412-33.
20. Hellerstein MK. De novo lipogenesis in humans: metabolic and regulatory aspects. Eur J Clin Nutr. 1999;53(Suppl 1):S53-65. Review.
21. Rowlands DS, Thorburn MS, Thorp RM, Broadbent S, Shi X. Effect of graded fructose coingestion with maltodextrin on exogenous 14C-fructose and 13C-glucose oxidation efficiency and high-intensity cycling performance. J Appl Physiol. 2008;104:1709-19.
22. McArdle WD, Katch FI, Katch VL. Fisiologia do exercício ± energia, nutrição e desempenho humano. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2011.
23. Gerich JE. Physiology of glucose homeostasis. Diabetes Obes Metab. 2000;2(6):345-50. Review.
24. Cersosimo E, Garlick P, Ferretti J. Renal substrate metabolism and gluconeogenesis during hypoglycemia in humans. Diabetes. 2000;49(7):1186-93.
25. Bjorntorp P, Sjostrom L. Carbohydrate storage in man: speculations and some quantitative considerations. Metabolism. 1978;27(12 Suppl. 2):1853-65.
26. Diraison F, Yankah V, Letexier D, Dusserre E, Jones P, Beylot M. Differences in the regulation of adipose tissue and liver lipogenesis by carbohydrates in humans. J Lipid Res. 2003;44(4):846–53.
27. Schwarz JM, Linfoot P, Dare D, Aghajanian K. Hepatic de novo lipogenesis in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects consuming high-fat, low-carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate isoenergetic diets. Am J Clin Nutr. 2003;77(1):43-50.
28. Dekker MJ, Su Q, Baker C, Rutledge AC, Adeli K. Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2010;299(5):E685-94.
29. Basciano H, Federico L, Adeli K. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. Nutr Metab (Lond). 2005;2(1):5.
30. Stanhope KL, Schwarz JM, et al. Effects of consuming fructose- or glucose-sweetened beverages for 10 weeks on lipids, insulin sensitivity and adiposity. J Clin Invest. 2009.
31. Jensen MD. Role of body fat distribution and the metabolic complications of obesity. J Clin Endocrinol Metab. 2008;93:S57--63.
32. Stanhope KL, Havel PJ. Fructose consumption: recent results and their potential implications. Ann N Y Acad Sci. 2010;1190:15-24.
33. Stanhope KL, Havel PJ. Fructose consumption: potential mechanisms for its effects to increase visceral adiposity and induce dyslipidemia and insulin resistance. Curr Opin Lipidol. 2008;19(1):16-24.
34. Stanhope KL, Bremer AA, Medici V, Nakajima K, Ito Y, Nakano T et al. Consumption of fructose and high fructose corn syrup increase postprandial triglycerides, LDL-cholesterol, and apolipoprotein-B in young men and women. J Clin Endocrinol Metab. 2011;96(10):E1596-605.
35. Taylor EN, Curhan GC. Fructose consumption and the risk of kidney stones. Kidney Int. 2008;73(2):207-12.
36. Silva RJ, De Angelis K. Aumento no consumo de frutose como fator de risco para o desenvolvimento de síndrome metabólica. Revista Eletrônica de Iniciação Científica da USJT. São Paulo; 2007.

37. Reiser S, Hallfrisch J. Metabolic effects of dietary fructose. CRC Press: Boca Raton; 1987.
38. Bray GA, Popkin BM. Dietary sugar and body weight: have we reached a crisis in the epidemic of obesity and diabetes? Health be damned! Pour on the sugar. Diabetes Care. 2014;37(4):950-6.
39. Ventura EE, Davis JN, Goran MI. Sugar content of popular sweetened beverages based on objective laboratory analysis: focus on fructose content. Obesity (Silver Spring). 2011;19(4):868-74.
40. Tappy L, Lê KA, Tran C, Paquot N. Fructose and metabolic diseases: new findings, new questions. Nutrition. 2010;26(11-12):1044-49.
41. DiNicolantonio JJ, O'Keefe JH, Lucan SC. Added fructose: a principal driver of type 2 diabetes mellitus and its consequences. Mayo Clin Proc. 2015;90(3):372-81.
42. Sloboda DM, Li M, Patel R, Clayton ZE, Yap C, Vickers MH. Early life exposure to fructose and offspring phenotype: implications for long term metabolic homeostasis. J Obes. 2014;203:474.
43. Ahangarpour A, Mohammadian M, Dianat M. Antidiabetic effect of hydroalcholic urticadioica leaf extract in male rats with fructose-induced insulin resistance. Iran J Med Sci. 2012;37:181-86.
44. [IOM] Institute of Medicine. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids. Washington, D.C: The National Academies Press; 2005.
45. World Health Organization; Food and Agriculture Organization. Population nutrient intake goals for preventing diet-related chronic diseases. In: World Health Organization; Food and Agriculture Organization. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Geneva: WHO; 2003.
46. World Health Organization. Guideline: Sugar intake for adult and children. Geneva: WHO; 2015.
47. Johnson RK, Appel LJ, Brands M, Howard BV, Lefevre M, Lustig RH et al. Dietary sugars intake and cardiovascular health: a scientific statement from the American Heart Association. Circulation. 2009;120(11):1011-20.
48. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação Geral da Política de Alimentação e Nutrição. Guia alimentar para a população brasileira. 2.ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2014.
49. [SBD] Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2013-2014. Rio de Janeiro: AC Farmacêutica; 2014.
50. Browning JD, Baker JA, Rogers T, Davis J, Satapati S, Burgess SC. Short-term weight loss and hepatic triglyceride reduction: evidence of a metabolic advantage with dietary carbohydrate restriction. Am J Clin Nutr. 2011;93(5):1048-52.
51. Silbernagel G, Machann J, Unmuth S, Schick F, Stefan N, Häring HU et al. Effects of 4-week very-high-fructose/glucose diets on insulin sensitivity, visceral fat and intrahepatic lipids: an exploratory trial. Br J Nutr. 2011;106(1):79-86.
52. De Koning L, Malik VS, Rimm EB, Willett WC, Hu FB. Sugar-sweetened and artificially sweetened beverage consumption and risk of type 2 diabetes in men. Am J Clin Nutr. 2011;93(6):1321-7.
53. Pollock NK, Bundy V, Kanto W, Davis CL, Bernard PJ, Zhu H et al. Greater fructose consumption is associated with cardiometabolic risk markers and visceral adiposity in adolescents. J Nutr. 2012;142(2):251-57.
54. Cox CL, Stanhope KL, Schwarz JM, Graham JL, Hatcher B, Griffen SC et al. Circulating concentrations of monocyte chemoattractant protein-1, plasminogen activator inhibitor-1, and soluble leukocyte adhesion molecule-1 in overweight/obese men and women consuming fructose- or glucose-sweetened beverages for 10 weeks. J Clin Endocrinol Metab. 2011;96(12):E2034-8.
55. Friberg E, Wallin A, Wolk A. Sucrose, high-sugar foods, and risk of endometrial cancer: a population-based cohort study. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2011;20(9):1831-37.
56. Gaby AR. Adverse effects of dietary fructose. Altern Med Rev. 2005;10(4):294-306.
57. Steinmann B, Gitzelman R, Berghe GVD. Disorders of fructose metabolism. In: Scriver C, Beaudet A, Sly W, editors. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8.ed. New York: McGraw Hill; 2001.
58. Thorens B, Mueckler M. Glucose transportes in the 21st Century. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009;298(2):E141-5.
59. Santer R, Schneppenheim R, Dombrowski A, Gotze H, Steinmann B, Schaub J. Mutations in GLUT2, the gene for the liver-type glucose transporter, in patients with Fanconi-Bickel syndrome. Nat Genet. 1997;17(3):324-26.
60. Rhead B, Karolchik D, Kuhn RM, Hinrichs AS, Zweig AS, Fujita PA, et al. The UCSC genome browser database: update. Nucleic Acids Res 2010;38:D613-19.
61. Le MT, Lobmeyer MT, Campbell M, et al. Impact of genetic polymorphisms of SLC2A2, SLC2A5, and KHK on metabolic phenotypes in hypertensive individuals. PLoS One 2013;8:e52062
62. Dalbeth N, House ME, Gamble GD, Horne A, Pool B, Purvis L et al. Population-specific influence of SLC2A9 genotype on the acute hyperuricaemic response to a fructose load. Ann Rheum Dis. 2013;72(11):1868-73.
63. Le MT, Shafiu M, Mu W, Johnson RJ. SLC2A9: a fructose transporter identified as a novel uric acid transporter. Nephrol Dial Transplant. 2008;23(9):2746-49.
64. Brandstatter A, Kiechl S, Kollerits B, Hunt SC, Heid IM, Coassin S et al. Sex-specific association of the putative fructose transporter SLC2A9 variants with uric acid levels is modified by BMI. Diabetes Care. 2008;31:1662-67.
65. Voruganti VS, Franceschini N, Haack K, Laston S, MacCluer JW, Umans JG et al. Replication of the effect of SLC2A9 genetic variation on serum uric acid levels in American Indians. Eur J Hum Genet. 2014;22(7):938-43.
66. Froesch ER. Disorders of fructose metabolism. Clin Endocrinol Metab. 1976;5(3):599-611.
67. Asipu A, Hayward BE, O'Reilly J, Bonthron DT. Properties of normal and mutant recombinant human ketohexokinases and implications for the pathogenesis of essential fructosuria. Diabetes. 2003;52:2426-32.
68. GeneCards Org, 2014. Disponível em: http://www.genecards.org/. Acesso em 25 set 2014.
69. Bonthron DT, Brady N, Donaldson IA, Steinmann B. Molecular basis of essential fructosuria: molecular cloning and mutational analysis of human ketohexokinase (fructokinase). Hum Mol Genet. 1994;3:1627-31.
70. Trinh CH, Asipu A, Bonthron DT, Phillips SE. Structures of alternatively spliced isoforms of human ketohexokinase. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2009;65(Pt 3):201-11.
71. Chambers RA, Pratt RT. Idiosyncrasy to fructose. Lancet. 1956;271(6938):340.
72. Wong D. IEM Digest – molecular genetics and metabolism. 2005;85:165-67.
73. Van den Berghe G. Inborn errors of fructose metabolism. Annu Rev Nutr. 1994;14:41-58.

74. Mayatepek E, Hoffmann B, Meissner T. Inborn errors of carbohydrate metabolism. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2010;24(5):607-18.
75. Baker L, Winegrad AI. Fasting hypoglycaemia and metabolic acidosis associated with deficiency of hepatic fructose-1,6-diphosphatase activity. Lancet. 1970;2(7662):13-6.
76. Visser G, Bakker HD, de Klerk JBC. Natural history and treatment of fructose 1,6-diphosphatase deficiency in the Netherlands. J Inherit Metab Dis. 2004;27(Suppl 1):207.
77. Lim JS, Mietus-Snyder M, Valente A, Schwarz JM, Lustig RH. The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2010;7(5):251-64.
78. Lin J, Puigserver P, Donovan J, Tarr P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. J Biol Chem. 2002;277(3):1645-8.
79. Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, Kitamura Y, Altomonte J, Dong H, Accili D, Spiegelman BM. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. Nature. 2003;423(6939):550-5.
80. Rhee J, Inoue Y, Yoon JC, Puigserver P, Fan M, Gonzalez FJ, Spiegelman BM. Regulation of hepatic fasting response by PPAR-gamma coactivator-1alpha (PGC-1): requirement for hepatocyte nuclear factor 4alpha in gluconeogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(7):4012-7.
81. Michael LF, Wu Z, Cheatham RB, Puigserver P, Adelmant G, Lehman JJ, Kelly DP, Spiegelman BM. Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98(7):3820-5.
82. Vega RB, Huss JM, Kelly DP. The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. Mol Cell Biol. 2000;20(5):1868-76.
83. Lin J, Handschin C, Spiegelman BM. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. Cell Metab. 2005;1(6):361-70
84. Faeh D, Minehira K, Schwarz JM, Periasamy R, Park S, Tappy L. Effect of fructose overfeeding and fish oil administration on hepatic de novo lipogenesis and insulin sensitivity in healthy men. Diabetes. 2005;54(7):1907-13.
85. Nagai Y, Yonemitsu S, Erion DM, Iwasaki T, Stark R, Weismann D, Dong J, Zhang D, Jurczak MJ, Löffler MG, Cresswell J, Yu XX, Murray SF, Bhanot S, Monia BP, Bogan JS, Samuel V, Shulman GI. The role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 beta in the pathogenesis of fructose-induced insulin resistance. Cell Metab. 2009;9(3):252-64.
86. Su Q, Tsai J, Xu E, Qiu W, Bereczki E, Santha M et al. Apolipoprotein B100 acts as a molecular link between lipid-induced endoplasmic reticulum stress and hepatic insulin resistance. Hepatology. 2009;50:77-84.
87. Roglans N, Vila L, Farre M, Alegret M, Sanchez RM, Vazquez-Carrera M et al. Impairment of hepatic Stat-3 activation and reduction of PPARalpha activity in fructose-fed rats. Hepatology. 2007;45:778-88.
88. Tsai J, Zhang R, Qiu W, Su Q, Naples M, Adeli K. Inflammatory NF- B activation promotes hepatic apolipoprotein B100 secretion: evidence for a link between hepatic inflammation and lipoprotein production. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2009;296:G1287-G1298.
89. Shapiro A, Mu W, Roncal C, Cheng KY, Johnson RJ, Scarpace PJ. Fructose-induced leptin resistance exacerbates weight gain in response to subsequent high-fat feeding. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2008;295:R1370-R1375.
90. Laudes M, Barroso I, Luan J, Soos MA, Yeo G, Meirhaeghe A, Logie L, Vidal-Puig A, Schafer AJ, Wareham NJ, O'Rahilly S. Genetic variants in human sterol regulatory element binding protein-1c in syndromes of severe insulin resistance and type 2 diabetes. Diabetes. 2004 Mar;53(3):842-6.
91. Nagata R, Nishio Y, Sekine O, Nagai Y, Maeno Y, Ugi S et al. Single nucleotide polymorphism (–468 Gly to A) at the promoter region of SREBP-1c associates with genetic defect of fructose-induced hepatic lipogenesis. J Biol Chem. 2004;279(28):29031-42.

7 Glutamina

Vinicius Fernandes Cruzat
Marcelo Macedo Rogero

INTRODUÇÃO

Entre os 21 aminoácidos conhecidos e nutricionalmente classificados de acordo com sua essencialidade, o composto $C_5H_{10}N_2O_3$, também chamado de glutamina, merece atenção especial. A glutamina é o aminoácido mais abundante do organismo, presente em quantidades muito superiores às de qualquer outro aminoácido no meio extracelular. Embora o papel imunomodulador da glutamina seja bastante conhecido e divulgado, uma grande variedade de funções orgânicas essenciais é influenciada e mediada por esse aminoácido. De fato, além da glicose, a glutamina é o principal nutriente para a manutenção da homeostasia corporal, não sendo possível sua substituição por outros compostos. Entre as principais funções da glutamina estão: sintetizar nucleotídeos, atuar como substrato energético, possibilitar o transporte de nitrogênio e destoxificação da amônia entre os tecidos, participar do sistema antioxidante, regular vias de sinalização relacionadas à defesa e ao reparo celular, entre outros. Sob o ponto de vista evolutivo, é difícil imaginar a sobrevivência, a manutenção e a proliferação de células sem a participação da glutamina. Não por acaso, desde a década de 1990 um grande número de trabalhos tem sido realizado com o intuito de investigar o papel e o envolvimento da glutamina no metabolismo. Entretanto, mais recentemente, há um acúmulo de evidências científicas apontando diversos mecanismos de ação desse aminoácido sobre a expressão de diversos genes. Considerando a importância da glutamina em praticamente todas as reações metabólicas e regulatórias do organismo, o presente capítulo aborda aspectos do metabolismo e mecanismos de ação desse aminoácido em diversos órgãos e tecidos.

ASPECTOS GERAIS

Em 1873, a glutamina foi considerada, pela primeira vez, uma molécula biologicamente importante, uma vez que, por evidências indiretas, foi caracterizada como um componente estrutural de proteínas. Em 1883, foi demonstrada a presença abundante de glutamina livre em determinadas plantas. Contudo, o número de estudos aumentou somente a partir dos trabalhos conduzidos por Sir Hans Adolf Krebs (1900-1981), na década de 1930. Nessa ocasião e pela primeira vez, Sir Krebs[1] verificou que tecidos de mamíferos têm a capacidade tanto de hidrolisar quanto de sintetizar esse aminoácido. Na década de 1950, Eagle et al.[2] evidenciaram que a glutamina era relevante para células *in vitro* e que sua concentração na circulação sanguínea era mais que o dobro quando comparada à de qualquer outro aminoácido.

A glutamina é um L-alfa-aminoácido de cinco carbonos, com peso molecular de 146,15 e composição elementar de carbono (41,09%), hidrogênio (6,90%), oxigênio (32,84%) e nitrogênio (19,17%). Em pH fisiológico, é classificada como um aminoácido neutro e, nutricionalmente, como um aminoácido não essencial.[3] A glutamina apresenta dois grupos amino: um grupo alfa-amino e um grupo amida terminal facilmente hidrolisável. Essas características ressaltam suas funções como um veículo de transporte de nitrogênio e carreador de amônia (NH_3). É o aminoácido livre mais abundante no músculo e no plasma humanos, também encontrado em concentrações relativamente altas em outros tecidos. Indivíduos considerados saudáveis, pesando aproximadamente 70 kg, apresentam cerca de 70 a 80 g de glutamina distribuídos por diversos tecidos corporais.[4] A concentração plasmática de glutamina constitui aproximadamente 20% do total de aminoácidos livres e, após jejum de 12 horas,

encontra-se entre 500 e 750 µmol/L, sendo dependente do equilíbrio entre a liberação e a captação de glutamina pelos órgãos e tecidos do organismo.[5]

A glutamina está presente na composição de proteínas vegetais e animais. Por exemplo, considerando a porcentagem da proteína pelo seu número de aminoácidos, verifica-se que a glutamina representa 35,1% da gliadina presente no trigo, 24,2% da proteína do feijão, 9,6% da glicinina presente na soja, 8,9% da beta-caseína presente no leite de vaca, 3,8% da ovalbumina presente no ovo de galinha e 2,9% da actina presente no músculo esquelético.[3]

Participando de reações orgânicas essenciais, incluindo o transporte de NH_3 entre tecidos, síntese de nucleotídeos e substrato energético para células do sistema imune, a glutamina apresenta inúmeras funções no organismo, o que reforça o papel relevante desse aminoácido tanto em estados de saúde quanto fisiopatológicos.[6] A diminuição da concentração plasmática de glutamina aliada ao aumento do metabolismo desse aminoácido ocorre de modo marcante em muitas doenças com elevado catabolismo. Essas situações levaram à reclassificação da glutamina como um aminoácido não essencial para um nutriente condicionalmente essencial.[3]

A partir dos trabalhos de Krebs e seu grupo, grande progresso tem sido feito, especialmente ao entender as diferentes vias metabólicas influenciadas pela expressão de genes responsivos à glutamina.

METABOLISMO DA GLUTAMINA

Pode-se considerar que a importância do metabolismo da glutamina ($C_5H_{10}N_2O_3$) para humanos é evidenciada por sua concentração no organismo. No sangue, ela é 10 a 100 vezes maior que a de qualquer outro aminoácido. Entre os órgãos envolvidos na síntese de glutamina incluem-se músculo esquelético, pulmões, fígado, cérebro e, possivelmente, tecido adiposo, os quais contêm atividade específica de síntese de glutamina. Por outro lado, tecidos que são primariamente consumidores de glutamina – células da mucosa intestinal, leucócitos e células do túbulo renal – contêm elevada atividade de enzimas e cofatores capazes de degradar glutamina.[7] Porém, sob certas condições – incluindo ingestão reduzida de carboidratos, doenças e estresse fisiológico intenso –, o fígado pode tornar-se um sítio consumidor de glutamina, e tecidos como o muscular podem ter a síntese de glutamina reduzida (Figura 7.1).[8] Outros diversos fatores podem modular a atividade das enzimas reguladoras do metabolismo da glutamina, especialmente glicocorticoides, hormônios tireoidianos, hormônio do crescimento e insulina.[4]

Diversas são as enzimas envolvidas no metabolismo da glutamina. As duas principais enzimas intracelulares são a glutamina sintetase (GS) e a glutaminase (GLS). A primeira é responsável pela reação que sintetiza glutamina a partir de NH_3 e glutamato, com consumo de trifosfato de adenosina (ATP) (Figura 7.2, reação B), enquanto a segunda é responsável pela hidrólise da glutamina, convertendo-a em glutamato e NH_3 novamente (Figura 7.2, reação C).[9] Quanto à localização intracelular, verifica-se que a GS é encontrada primariamente no citosol, enquanto a GLS, na sua forma ativa, está principalmente no interior mitocondrial. Essas localizações são compatíveis com as funções dessas enzimas: GS produzindo glutamina para síntese de proteínas citoplasmáticas e nucleotídeos e GLS catalisando a utilização de glutamina como fonte de energia.[10] A hidrólise da glutamina representa o primeiro passo na sua utilização a partir da síntese do glutamato. Outras reações podem ocorrer principalmente na via que permite o consumo de glutamina no ciclo do ácido tricarboxílico.[11]

A síntese de glutamina por meio da GS ocorre a partir da disponibilidade de glutamato. Por sua vez, o glutamato é sintetizado a partir de 2-oxaglutarato e íon amônio (NH_4), pela ação da enzima glutamato desidrogenase (Figura 7.2, reação A), ou ainda a partir do catabolismo de outros aminoácidos, incluindo os aminoácidos de cadeia ramificada (ACR), especialmente a leucina.[4,12] Estudos em ratos demonstram que os ACR, o que inclui a leucina, por exemplo, podem ser transaminados quase exclusivamente como alfa-cetoglutarato para formar glutamato, o qual pode fornecer seu grupo amino para formar piruvato, gerando alanina, ou incorporar amônia livre, dando origem à glutamina.[13]

Tanto as concentrações teciduais quanto as sanguíneas de glutamina podem ser influenciadas de acordo com a atividade da GS ou da GLS (Figura 7.1). Em situações catabólicas como sepse,[14,15] infecções,[16] cirurgias,[17] traumas[18] e exercícios físicos intensos e prolongados,[19] a síntese endógena de glutamina não supre a demanda exigida pelo organismo. Em tais casos de carências, a glutamina assume o papel de um aminoácido condicionalmente essencial, tanto por um aumento da expressão da enzima GLS quanto pela concomitante inibição da ação da GS.[21] Apesar disso, é importante salientar que, embora a concentração plasmática de glutamina torne-se reduzida, passando de sua concentração normal (500 a 750 µmol/L) para 300 a 400 µmol/L, células que dependem desse aminoácido, como as do sistema imune, são de fato pouco influenciadas em termos de proliferação e função celular.[22] Por outro lado, o elevado catabolismo tecidual leva à redução dos estoques teciduais, especialmente músculos e fígado. A menor concentração tecidual de glutamina tem impacto em todo o organismo, uma vez que a glutamina pode ceder átomos de nitrogênio para a

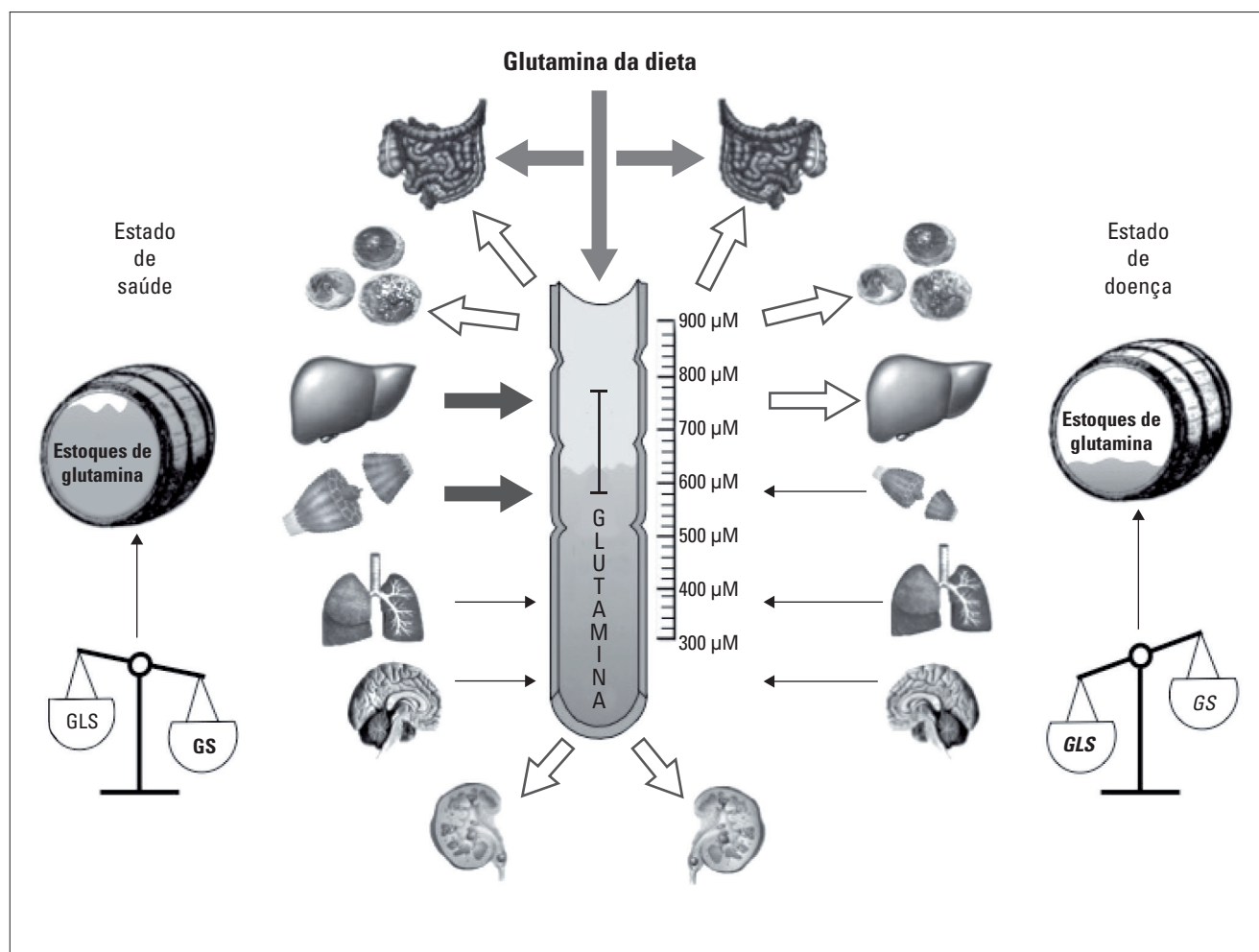



Figura 7.1 Metabolismo da glutamina no estado de saúde e doença/estresse. Tecidos como cérebro, pulmões, fígado, músculo esquelético e intestino exibem ambas as enzimas GLS (glutaminase) e GS (glutamina sintetase). Células do sistema imune e rins não possuem GS, o que confere papel essencial de consumidor de glutamina ao organismo, independentemente do estado fisiológico. No estado de saúde ou alimentado, os estoques de glutamina tecidual e plasmática encontram-se em equilíbrio, mantidos principalmente pelo fígado e músculos esqueléticos. Entretanto, em situações de elevado catabolismo, os estoques são afetados, uma vez que o fígado se torna um sítio consumidor, e rins, intestino e leucócitos aumentam sua dependência de consumo por glutamina. O resultado do desequilíbrio entre a síntese e a degradação resulta em deficiência de glutamina. **Fonte:** adaptada de Rogero e Tirapegui.[20]

síntese de purinas, pirimidinas e aminoaçúcares.[23] Na continuidade da elevada degradação tecidual de glutamina, um grande número de vias metabólicas e mecanismos dependentes é afetado, promovendo, por exemplo, imunossupressão.

MÚSCULO ESQUELÉTICO

O metabolismo da glutamina está diretamente ligado ao músculo esquelético, que é quantitativamente o local mais relevante de estoque, síntese e liberação de glutamina, embora a atividade da enzima GS seja relativamente baixa por unidade de massa no tecido muscular.[24] Desta forma, o músculo esquelético exerce fundamental papel no metabolismo da glutamina por ser um dos maiores tecidos (quantitativamente) do organismo. O conteúdo intramuscular de glutamina corresponde a 50 a 60% do total de aminoácidos livres nesse tecido. Aproximadamente 80% da glutamina corporal está no músculo esquelético, e essa concentração é 30 vezes superior à do plasma.[25]

As concentrações de aminoácidos livres no tecido muscular são dependentes do tipo de fibra muscular. Estudos realizados com músculo esquelético de ratos têm demonstrado que os estoques de glutamina são três vezes maiores em fibras musculares de contração lenta (fibras do tipo 1) do que em fibras musculares de contração rápida (fibras do tipo 2). Uma possível causa da maior concentração de glutamina em fibras de contração lenta pode ser decorrente da atividade elevada da enzima GS e maior disponibilidade de ATP para a síntese de glutamina.[28]

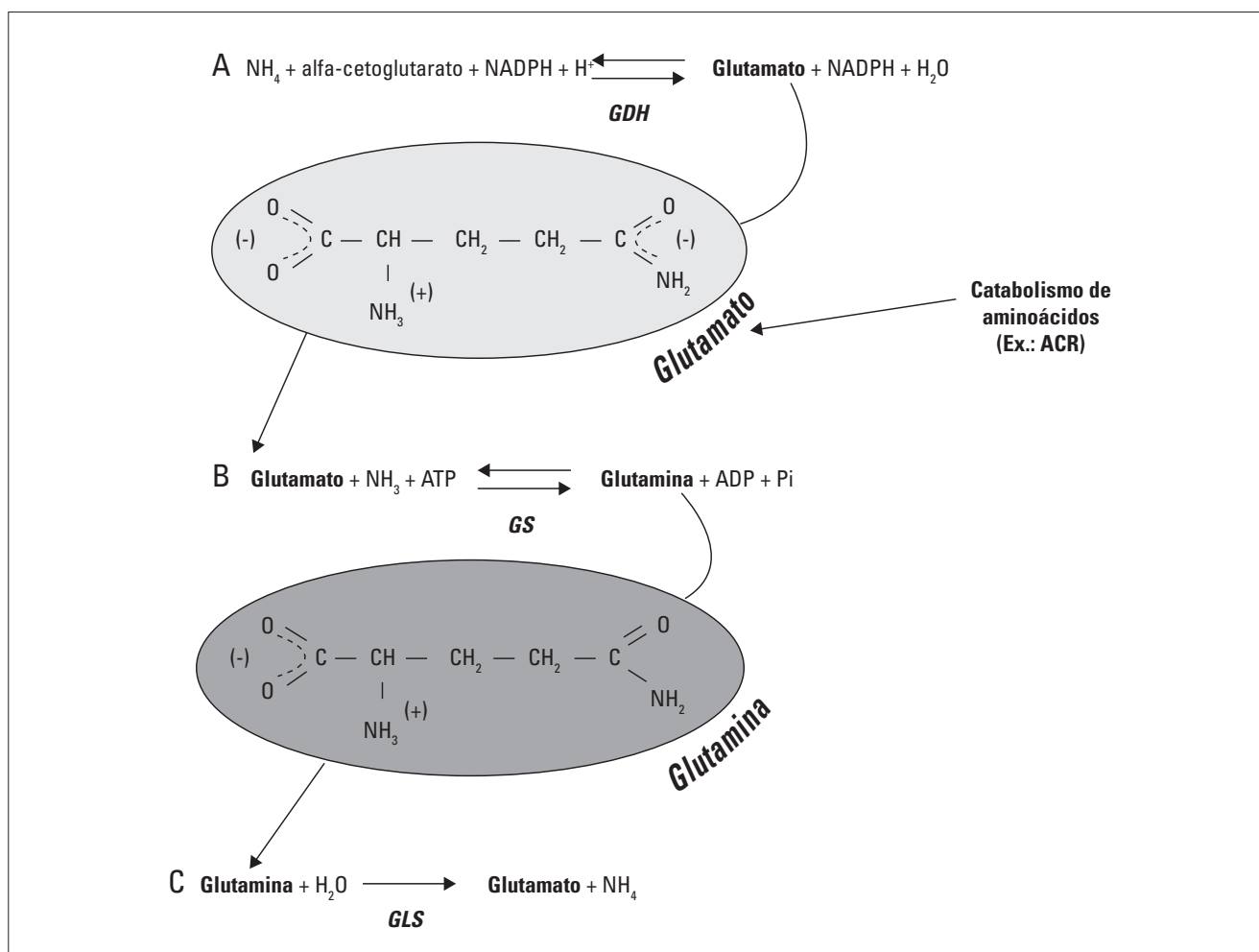



Figura 7.2 Reação A: síntese de glutamato catalisada pela enzima glutamato desidrogenase (GDH). Reação B: síntese de glutamina catalisada pela enzima glutamina sintetase (GS). Reação C: hidrólise da glutamina catalisada pela enzima glutaminase (GLS). Alternativamente, o glutamato pode ser fornecido a partir de outros aminoácidos envolvendo uma variedade de enzimas. ACR: aminoácidos de cadeia ramificada; ADP: adenosina difosfato; ATP: adenosina trifosfato; NH_3: amônia; Pi: fosfato inorgânico. **Fonte:** adaptada de Rogero e Tirapegui;[26] Tirapegui e Cruzat.[27]

Hormônios como a insulina e os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF) estimulam o transporte de glutamina para o meio intracelular, ao passo que glicocorticoides estimulam a liberação de glutamina para o meio extracelular. O gradiente transmembrana através da célula muscular é elevado para a glutamina. A existência desse gradiente de concentração torna restrita a difusão livre através da membrana celular. A glutamina é ativamente transportada para dentro das células através de um sistema dependente de sódio, resultando em gasto de energia. O transporte de glutamina através da membrana da célula muscular é rápido, e sua velocidade é superior à de todos os outros aminoácidos. A estabilização da concentração de glutamina observada no fluido intracelular e o gradiente de concentração através da membrana devem ser o efeito combinado de: afinidade do sistema de transporte; influência de outros aminoácidos competindo por moléculas carreadoras; razão intracelular de síntese e utilização; fornecimento extracelular; taxa de fluxo através da membrana celular; e quantidades intra e extracelulares de sódio.[8,26]

Durante o estado pós-absortivo, aproximadamente 50% da síntese de glutamina no músculo esquelético ocorre por meio da captação de glutamato a partir da circulação sanguínea, caracterizando parte do ciclo glutamina-glutamato. O papel relevante do glutamato pode ser observado por meio da administração de um inibidor da GS (sulfoximina de metionina), que, segundo Koyama et al.,[29] promoveu elevação de 10 vezes da concentração de glutamato no plasma quatro horas após o tratamento, fato este aliado à diminuição da concentração plasmática de glutamina e concomitante aumento da concentração de NH_3 no plasma. Além disso, o catabolismo proteico muscular produz glutamina diretamente, mas também leva à liberação de ACR, glutamato, aspartato e asparagina. Os esqueletos de carbono desses aminoácidos são utilizados para a síntese *de novo* de glutamina (Figura 7.3).[30]

Estudos em ratos demonstram que ACR são transaminados, quase exclusivamente, com alfa-cetoglutarato para formar glutamato, o qual pode transferir seu grupo amino para o piruvato formando alanina, ou incorporar NH_3 livre para formar glutamina. ACR não são completamente metabolizados porque a 2-oxoisovalerato desidrogenase (enzima chave no controle da taxa de oxidação de ACR) se apresenta quase totalmente na forma inativa no músculo esquelético. Assim, músculos de rato captam ACR, inicialmente para utilizá-los como fornecedores de nitrogênio na formação de glutamina e alanina.[30,31]

No estado pós-absortivo, glutamina e alanina correspondem a respectivamente 48% e 32% dos aminoácidos liberados pelo músculo esquelético. A glutamina com dois átomos de nitrogênio por molécula é a principal fonte de liberação de nitrogênio a partir do músculo. As taxas de trocas de glutamina e alanina excedem os seus estoques corporais, e sua ocorrência na proteína muscular é de apenas 10 a 15%, indicando que há uma constante necessidade da síntese *de novo* desses aminoácidos no músculo. A taxa de síntese de glutamina no músculo esquelético – aproximadamente 50 mmol/h – é mais alta que a de qualquer outro aminoácido.[32] Deste modo, glutamina e alanina devem ser formadas como produtos da interconversão de aminoácidos dentro da célula, em um processo dependente das suas condições metabólicas, as quais são afetadas pelos estados nutricional, hormonal e também pelo exercício físico. Segundo Hood e Terjung,[33] as contrações musculares aumentam a taxa de metabolismo do piruvato, a produção de

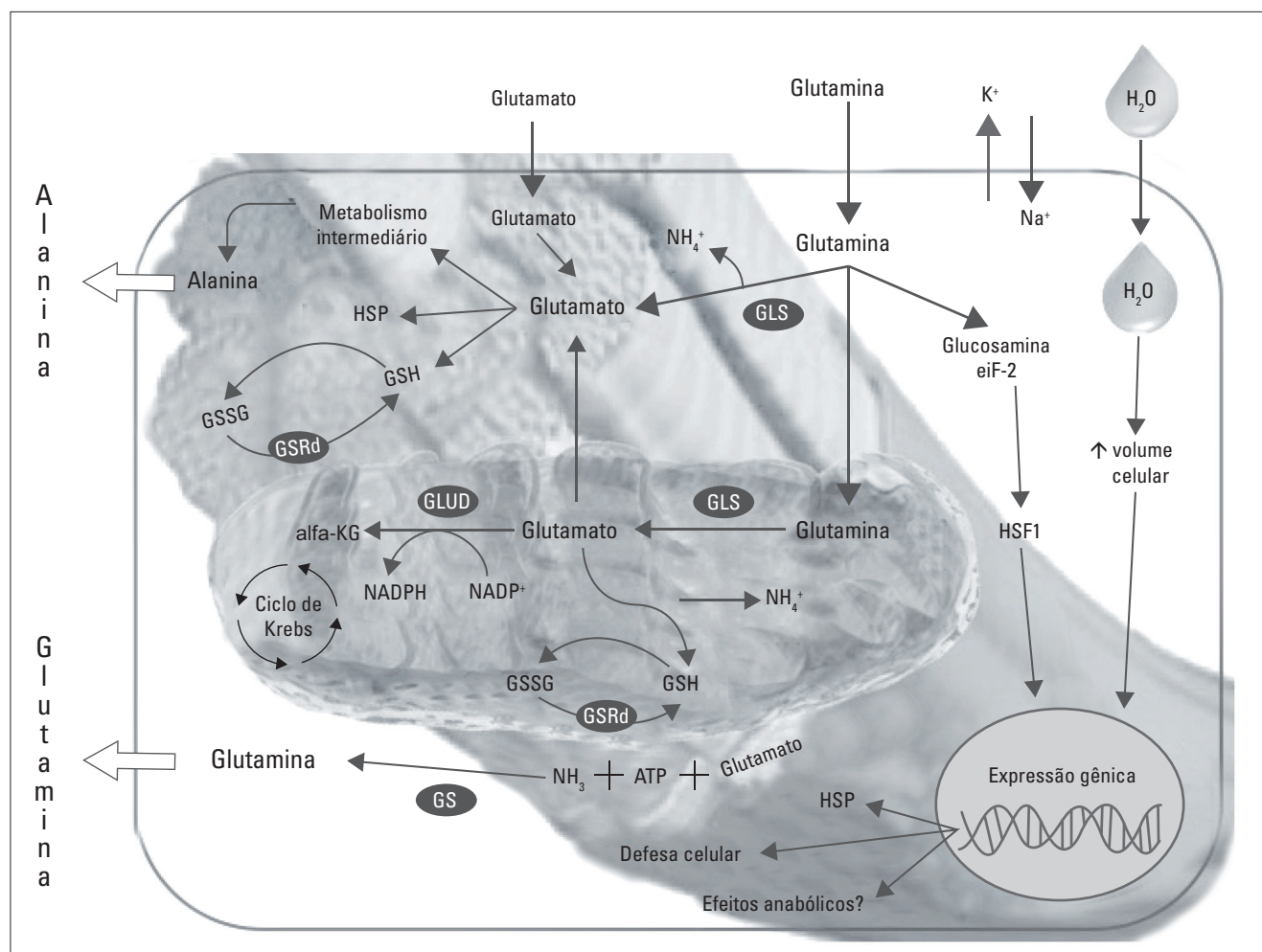



Figura 7.3 Metabolismo de glutamina em células do músculo esquelético. A partir de glutamina, glutamato é produzido pela atividade da enzima glutaminase (GLS), liberando íon amônio (NH_4^+). Dentro das mitocôndrias ou no citosol, o glutamato é um importante precursor para a síntese de compostos do metabolismo intermediário, o que inclui o aminoácido alanina, antioxidantes como a glutationa (GSH) e a expressão de proteínas de choque térmico (HSP) envolvidas na reparação de danos celulares. Especula-se que a capacidade de a glutamina regular a síntese de HSP esteja associada à via das glicosaminas. Células, especialmente do tecido muscular, podem sintetizar glutamina a partir da glutamina sintetase (GS), utilizando glutamato, ATP e amônia (NH_3). O transporte de glutamina para dentro das células ocorre por meio de transporte ativo, associado à bomba de sódio (Na^+) e potássio (K^+) ATPase, a qual promove concomitante aumento da absorção de água. Esse fato altera o volume celular e pode estar associado à resistência a danos e ao estímulo da expressão de genes envolvidos com vias anabólicas. Alfa-KG: alfa-cetoglutarato; ATP: trifosfato de adenosina; eiF-2: fator de iniciação eucariótico 2; GLUD: glutamato desidrogenase; GSH: glutationa reduzida; GSRd: glutationa redutase; GSSG: glutationa oxidada; HSF1: fator de choque térmico 1. **Fonte:** Tirapegui e Cruzat.[27]

lactato, a transaminação de aminoácidos e a amoniagênese, determinantes importantes da formação de alanina e glutamina durante o exercício físico.

A glutamina apresenta papel relevante na regulação da síntese e da concentração de proteína no tecido muscular, uma vez que o aumento da concentração intramuscular de glutamina eleva significantemente a taxa de síntese proteica. Esse fato é relacionado ao aumento do volume celular, o qual atua como um sinal anabólico intracelular. Desse modo, o conhecimento do metabolismo muscular da glutamina é fundamental em diversos estados clínicos e catabólicos e durante o período de recuperação após exercício exaustivo, uma vez que estão relacionados à diminuição da concentração intramuscular de glutamina.[34]

GLUTAMINA E EXPRESSÃO GÊNICA NO TECIDO MUSCULAR

A perda de peso e a fadiga do organismo em fases de estresse metabólico e processos infecciosos representam parte de um problema ainda não resolvido em indivíduos agudamente enfermos e inflamados. A redução da massa muscular durante o estado de sepse ocorre por um desequilíbrio no balanço da síntese e da degradação proteica, alterando a concentração de proteínas totais no organismo, promovendo balanço nitrogenado negativo.

Por ser o aminoácido mais abundante e crucial ao metabolismo celular, a redução da disponibilidade de glutamina pode influenciar uma variedade de funções, alterando a expressão de genes fundamentais do controle homeostático. Em um dos primeiros estudos a respeito do metabolismo muscular da glutamina em situações catabólicas, verificou-se que a redução da concentração desse aminoácido no músculo esquelético está relacionada à redução na taxa de sobrevida de pacientes em estado de sepse.[15] Curiosamente, a diminuição intensa da concentração de glutamina muscular em pacientes gravemente enfermos (redução em média de 80% do normal decorrente da degradação proteica) é acompanhada por um aumento na síntese e na liberação de glutamina a partir do músculo esquelético.[35] Isso se deve ao fato de o RNA mensageiro (RNAm) e a atividade da enzima GS estarem aumentados no músculo esquelético durante estados catabólicos graves.[36]

A expressão da enzima GS é regulada principalmente por dois mecanismos: aumento da transcrição em resposta à ação hormonal e regulação da estabilidade da proteína GS em resposta à concentração intracelular de glutamina livre. No tecido muscular, glicocorticoides podem aumentar a quantidade de RNAm da GS em um processo dependente do receptor de glicocorticoides, presente no citosol. Após a ligação do glicocorticoide ao seu receptor citosólico, ocorre a sua translocação para o núcleo, onde ligam-se a regiões contendo elementos de resposta a glicocorticoides, as quais promovem indução da transcrição do gene da GS, entre outros (Figura 7.4).[37] Embora a atividade da GS seja aumentada em resposta ao estresse fisiológico, o aumento da quantidade da proteína pode não ocorrer paralelamente ao do RNAm, o que sugere a existência de mecanismos de controle pós-transcricionais. Desse modo, a atividade dessa enzima parece ser controlada pela concentração intracelular de glutamina por meio de um mecanismo de controle pós-transcricional, que promove o aumento da atividade da enzima GS quando há diminuição da concentração intracelular de glutamina. Não obstante, verifica-se que a enzima GS é relativamente instável na presença de glutamina e, desse modo, o aumento da concentração intracelular desse aminoácido promove a degradação da GS mais rapidamente (Figura 7.4). Além disso, os glicocorticoides e a depleção de glutamina intracelular agem sinergisticamente, promovendo o aumento da expressão da GS no músculo esquelético.[38]

Estudos *in vitro* com diversos tipos de células têm demonstrado que a glutamina também pode alterar a ex-

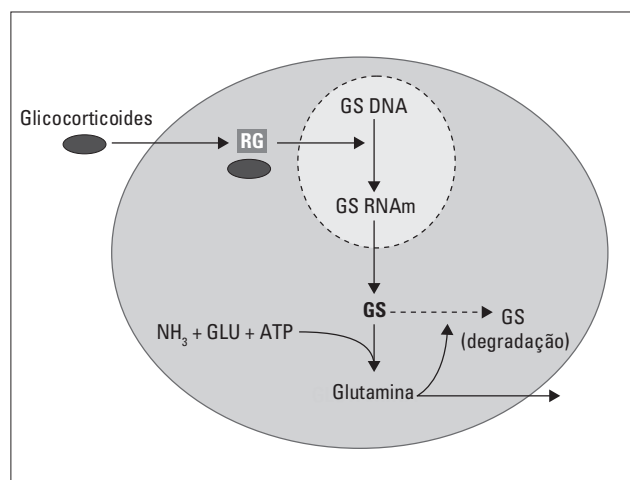



Figura 7.4 Regulação da síntese de glutamina no músculo esquelético. Glicocorticoides são mediadores relevantes da síntese de glutamina durante o estresse fisiológico. Após sua entrada na célula, esses hormônios podem se ligar ao receptor citosólico de glicocorticoides (RG), translocar para o núcleo (círculo com linhas pontilhadas) e promover o aumento da transcrição do gene que codifica a enzima glutamina sintetase (GS). Apesar da concentração de RNAm aumentar em até 10 vezes em resposta ao estresse agudo, a concentração da proteína GS e a atividade podem não aumentar na mesma proporção. A enzima GS – que sintetiza glutamina a partir de glutamato (GLU) e amônia (NH_3) – é relativamente instável na presença de glutamina e, quando a concentração intracelular de glutamina é alta, a enzima GS é degradada mais rapidamente. Esse mecanismo de controle por *feedback* permite que o músculo esquelético tenha controle preciso da síntese de glutamina de acordo com o estado de estresse e a demanda de glutamina. ATP: adenosina trifosfato. **Fonte:** adaptada de Labow et al.[38]

pressão gênica de proteínas contráteis. Em um estudo, o crescimento e a maturação de cardiomiócitos foram acompanhados pelo aumento do conteúdo do RNAm de proteínas como a alfa-miosina de cadeia pesada (α-MHC) e alfa-actina, ambos parâmetros considerados de hipertrofia não patológica.[39] Outros estudos apontam para a importância da glutamina em mediar a ativação de vias como a do mTOR, considerado um regulador essencial para o tamanho e a massa tecidual, seja em situações saudáveis ou de doença.[40] De fato, a utilização de aminoácidos, especialmente a leucina, como indutores anabólicos para células musculares tem sua ação comprometida via mTOR quando não há disponibilidade de glutamina.[12] Apesar da participação essencial da glutamina na regulação da expressão de genes ligados ao conteúdo muscular, não há estudos *in vivo* comprobatórios de que a suplementação isolada possa promover aumentos de massa muscular.[4,27,40]

Outro papel relevante exercido pela glutamina está associado à capacidade de modular respostas de proteção e resistência a lesões, também conhecidas como efeitos antioxidantes e citoprotetores. O estresse oxidativo elevado produzido em situações de catabolismo promove diversos efeitos que culminam em estímulos pró-apoptóticos, por meio de vias clássicas como a do fator nuclear kappa B (NF-κB). As espécies reativas do oxigênio (ERO) tanto radicalares quanto não radicalares reagem com minerais, membranas fosfolipídicas, proteínas, entre outros compostos importantes para a homeostasia celular.[41] A glutamina pode modular a expressão de proteínas sensíveis ao choque térmico (HSP). Em um estudo com camundongos agudamente inflamados (submetidos à endotoxemia, um modelo de sepse), a maior disponibilidade de glutamina tecidual promoveu a manutenção da expressão de HSP, especialmente a família de 70 kda (forma mais abundante), 90 e 27 kda. Os resultados em músculos esqueléticos e fígado foram obtidos tanto no nível proteico quanto de expressão gênica.[14] Além disso, outros genes demostraram ser bastante responsivos à glutamina, incluindo o fator de choque térmico 1 (HSF-1), importante para a síntese de HSP, e enzimas ligadas ao sistema antioxidante. De fato, como ilustrado na Figura 7.3, o glutamato doado a partir da glutamina é substrato essencial para a síntese de glutationa, fato que altera a expressão de genes como o da glutationa S-redutase (GSR) e glutationa peroxidase 1 (GPx1). As propriedades citoprotetoras e antioxidantes da glutamina podem ser particularmente importantes em situações de elevado catabolismo ao modular a atividade e a expressão das vias inflamatórias mediadas pelo NF-κB.[42]

GLUTAMINA E EXPRESSÃO GÊNICA NO INTESTINO

O intestino delgado é o órgão que mais utiliza glutamina no organismo. Esse aminoácido é quantitativamente mais relevante que a glicose como substrato energético nos enterócitos. Nessas células, o carbono da glutamina pode ser metabolizado por meio de duas vias principais: (1) formando delta1-pirrolina-5-carboxilato; (2) via alfa-cetoglutarato, como um intermediário do ciclo de Krebs. A primeira via promove a formação de prolina, ornitina e citrulina a partir do carbono da glutamina, utilizando cerca de 10% da concentração intestinal desse aminoácido. Outros 10 a 15% da glutamina são incorporados à proteína tecidual, sendo a maior proporção (cerca de 75%) metabolizada no ciclo de Krebs para produção de energia (Figura 7.5).[43]

A hidrólise da glutamina em glutamato – catalisada pela enzima glutaminase – corresponde à primeira reação na sua utilização. O intestino apresenta elevada atividade da enzima glutaminase (3-6 μmol/hora/mg de proteína), a qual tem alta afinidade pelo substrato, o que é consistente com a baixa concentração de glutamina nesse tecido, ou seja, há uma correlação entre a presença de glutaminase e a utilização de glutamina por determinado tipo celular. Na célula intestinal, praticamente toda a glutaminase está ligada à membrana mitocondrial. A modulação da atividade dessa enzima no intestino é relevante para a manutenção da integridade desse tecido, para a absorção adequada de nutrientes e para a prevenção de septicemia. Estados de jejum prolongado e subnutrição estão associados à redução da atividade da glutaminase no intestino; por outro lado, a atividade dessa enzima é aumentada no período pós-prandial, após administração de alimentação enteral, de aminoácidos de cadeia ramificada e de L-alanil-L-glutamina.[44]

No enterócito, a glutamina estimula a síntese proteica e reduz a proteólise dependente de ubiquitina, uma vez que esse aminoácido promove redução da expressão gêni-

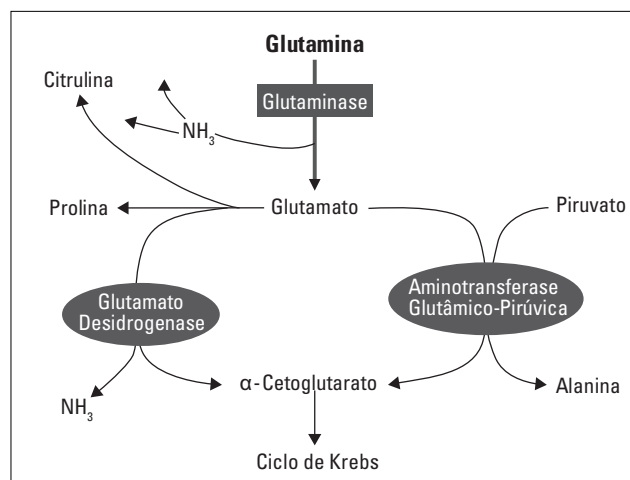



Figura 7.5 Vias do metabolismo da glutamina nas células da mucosa do intestino delgado. NH_3: amônia. **Fonte:** adaptada de Souba et al.[44]

ca da ubiquitina. A glutamina pode aumentar a expressão gênica da enzima arginino-succinato sintase em células Caco-2 (célula de linhagem epitelial do cólon de humanos). A glutamina ativa as quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK) e quinases amino-terminal c-Jun (JNK) no enterócito, o que resulta em significativo aumento da expressão gênica de c-Jun e da atividade do fator de transcrição designado proteína ativadora 1 (AP-1). Tal ação da glutamina potencializa os efeitos dos fatores de crescimento sobre a proliferação e o reparo celular.[40]

O choque térmico (43°C) induz morte celular epitelial intestinal; na ausência de glutamina, esse fato é exacerbado. Todavia, a exemplo do que acontece com o tecido muscular, a suplementação com glutamina promove redução dose-dependente na morte celular associada ao choque térmico. Esse efeito da glutamina, em parte, é decorrente da sua capacidade de aumentar a expressão gênica de HSP70.[45-47]

Figura 7.6 Metabolismo da glutamina em macrófagos e linfócitos. Enzimas estão indicadas por números. 1. glutaminase; 2: aspartato aminotransferase; 3: enzimas do ciclo de Krebs; 4: malato desidrogenase NAD-dependente; 5: enzima málica; 6: fosfoenolpiruvato carboxiquinase; 7: piruvato quinase; 8: lactato desidrogenase; PEP: fosfoenolpiruvato. **Fonte:** adaptada de Calder.[53]

GLUTAMINA, CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE, EXPRESSÃO GÊNICA E IMUNODULAÇÃO

O organismo protege-se contra microrganismos por meio de diferentes mecanismos, dentre os quais a imunidade inata, ou natural, e a adquirida. Os principais componentes da imunidade inata são as barreiras físicas e químicas, como epitélio e substâncias microbicidas produzidas pela superfície epitelial; proteínas sanguíneas, incluindo o sistema complemento e outros mediadores do processo inflamatório; células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos); e outros leucócitos como as células *natural killer*. Já os linfócitos T e B são responsáveis pela imunidade adquirida do organismo. As células T fazem parte da resposta imune celular e proliferam ativamente quando estimuladas por interleucina-2 (IL2) ou por mitógenos, como a concanavalina A. Os linfócitos B são os precursores das células produtoras de anticorpos.[48]

Figura 7.7 A proliferação de linfócitos depende da concentração de glutamina no meio extracelular. Experimento com linfócitos obtidos a partir do baço de ratos e incubados em meio de cultura contendo antibióticos. As células foram expostas a estímulo mitogênico de linfócitos T (concanavalina A) e incubados com diferentes concentrações de glutamina. A proliferação é expressa mediante aumento da radioatividade medida pela incorporação de timidina ao DNA no período de 18 a 66 horas de incubação. **Fonte:** adaptada de Yaqoob e Calder.[54]

Embora a glicose seja um nutriente essencial para suprir a demanda energética de células do sistema imune, estudos da década de 1980 demonstraram que linfócitos e macrófagos podem utilizar glutamina em taxas muito semelhantes ou ainda maiores que a própria glicose.[49,50] Linfócitos e macrófagos, por exemplo, têm a capacidade de utilizar glicose e glutamina para síntese energética e diversas macromoléculas (Figura 7.6), o que inclui mediadores inflamatórios e enzimas envolvidas com a defesa celular. Atualmente sabe-se que células do sistema imune dependem da disponibilidade de glutamina para exercer suas funções, bem como para se diferenciar e proliferar (Figura 7.7), especialmente em situações catabólicas e de estresse.[51]

A glicose é convertida principalmente em lactato (glicólise), enquanto a glutamina segue a sua conversão para glutamato e aspartato sofrendo oxidação parcial para CO_2, via processo denominado glutaminólise, essencial para o funcionamento efetivo de células do sistema imune. A glicólise fornece ribose-5-fosfato, precursora da síntese de RNA e DNA, e glicerol 3-fosfato para a síntese de fosfolipídios. Já a degradação de glutamina, amônia e aspartato, que são utilizados na síntese de purinas e pirimidinas, é fundamental para a formação de DNA e RNA.

Cabe ressaltar que o processo de proliferação de linfócitos T e B, como também as taxas de síntese proteica, produção de IL-2 e síntese de anticorpos dessas células, são dependentes de glutamina. Especificamente em macrófagos, síntese e secreção de citocinas pró-inflamatórias – como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), IL1 e IL6, que são quantitativamente relevantes – também são processos dependentes da concentração de glutamina extracelular.[23]

Os neutrófilos apresentam aumento do consumo de glicose relacionado ao processo de endocitose e geração de ERO. Porém, a glicose não é o único metabólito energético utilizado por essas células. Estudos recentes demonstraram que neutrófilos também consomem ativamente glutamina, sendo a taxa de utilização desse aminoácido por neutrófilos, assim como por linfócitos e macrófagos, similar ou até mesmo superior quando comparada à glicose. A capacidade para reconhecer e eliminar invasores depende, em grande parte, da ativação de proteínas associadas à inflamação e à desgranulação de células especializadas.[23] Neutrófilos utilizam estruturas proteicas compostas por cromatina descondensada e fatores antimicrobianos, também chamados de armadilhas extracelulares dos neutrófilos (NET, *neutrophilic extracellular traps*). A ação dos NET requer a formação de ERO, síntese de enzimas como a mieloperoxidase (MPO) e a elastase, componentes capazes de anular fatores de virulência e destruir bactérias extracelulares.[52] O processo que envolve as ERO é dependente da ativação do complexo NADPH oxidase 2 (NOX2). A partir da glutamina, a síntese de malato, por meio da enzima málica, produz quantidades substanciais de NADPH, o qual é necessário para a formação do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) que exerce ação antimicrobiana. De forma similar, os macrófagos utilizam taxas elevadas de glutamina para a síntese de óxido nítrico (NO) pela ação da enzima NO sintase induzível (iNOS), utilizando NADPH como fonte energética.[23]

Os linfócitos possuem alta atividade da enzima glutaminase dependente de fosfato e, sendo esta uma enzima mitocondrial, é provável que o caminho metabólico da glutamina na mitocôndria seja: glutamina → glutamato → oxoglutarato → succinil-CoA → succinato → fumarato → malato. Nessa perspectiva, parte do malato pode ser convertido em oxaloacetato e, posteriormente, transaminado com o glutamato para produzir oxoglutarato e aspartato. O restante do malato pode ser transportado dentro do citosol, onde pode seguir o seguinte destino: conversão para oxaloacetato, que pode ser transaminado com glutamato pela enzima aspartato aminotransferase citosólica, ou convertido para fosfoenolpiruvato por meio da enzima carboxiquinase para a formação de piruvato e, consequentemente, lactato pelas enzimas piruvato quinase e lactato desidrogenase, respectivamente.[23]

As concentrações plasmáticas e teciduais de glutamina estão diminuídas em situações clínicas e catabólicas como trauma, queimadura, sepse e pós-operatório. Nessas circunstâncias, a diminuição da concentração plasmática de glutamina ocorre porque a taxa de captação e utilização desse aminoácido por diversos tecidos é superior à velocidade de síntese e liberação pelo músculo esquelético. Além disso, durante processos catabólicos, a captação de glutamina pelos intestinos e rins, a partir da circulação sanguínea, é elevada. Essas situações estão associadas ao aumento na suscetibilidade a infecções, sugerindo que isso possa se dar, em parte, em razão da diminuição do fornecimento de glutamina para células imunocompetentes, como linfócitos.[55]

É provável que, dentre os diversos compostos conhecidos como imunomoduladores, a glutamina seja o mais famoso. A prática da utilização exógena de glutamina baseia-se na ideia de atenuar os efeitos deletérios promovidos por sua baixa disponibilidade no organismo em situações catabólicas. Em estados enfermos e inflamatórios, incluindo cirurgias, traumas e infecções, o consumo de glutamina por linfócitos, por exemplo, aumenta intensamente, uma vez que a atividade e a expressão da GLS estão elevadas em diversas vezes, quando comparada ao estado saudável (Figura 7.1).[56]

O aumento da demanda de glutamina por células do sistema imune, em conjunto com a elevação da utilização desse aminoácido por outros tecidos, leva o organismo a um déficit de glutamina. Esse efeito, dependendo da situação, pode contribuir para o agravamento da doença e infecção, com possíveis implicações no risco de vida, uma vez que células do sistema imune têm suas vias antimicrobianas prejudicadas. É bastante comum verificar que células do sistema imune têm sua expressão gênica alterada em condições de baixa disponibilidade de glutamina.

Em um estudo com neutrófilos, a glutamina na concentração de 2 mmol/L (2 a 3 vezes maior que as concentrações fisiológicas) foi capaz de atenuar os efeitos inibitórios da síntese de $O_2^{\bullet-}$ induzido pela adrenalina em situações de estresse.[57] Além disso, demonstrou-se que a glutamina modula componentes do complexo sistema NADPH oxidase, aumentando a expressão de genes como o *Gp91*phox, *P22*phox e *P47*phox em neutrófilos de ratos[58] e outros tipos celulares.[59] Um dos mais importantes mecanismos mediados pela glutamina na proliferação de células envolve a ativação das proteínas ERK e JNK.[60] Ambas atuam na ativação de fatores de transcrição, como a JNK e a AP-1, o que resulta na transcrição de genes envolvidos com a proliferação celular.[61] Nesse sentido, a glutamina não somente serve como substrato energético para leucócitos, mas também atua de forma essencial na proliferação celular e reparação celular.[62]

Tanto em estudos *in vitro* e *in vivo*, a glutamina é um potente modulador da expressão da HSP de 72 kda (HSP72), constituinte da família da HSP70.[14,21,63] Esse efeito da glutamina influencia a resposta inflamatória, uma vez que reduz a liberação de citocinas pró-inflamatórias. As HSP podem reduzir a expressão de citocinas com ação pró-inflamatória por meio da sua ligação ao elemento de choque térmico presente na região promotora do gene da IL-1beta e potencialmente de outras citocinas, processo que resulta em uma redução da resposta pró-inflamatória.

A glutamina em concentrações similares àquelas verificadas no plasma de humanos promove aumento significativo da expressão gênica da HSP72 em células mononucleares do sangue periférico após tratamento com LPS. Por outro lado, a redução da concentração de glutamina resulta em redução da expressão da HSP72 em monócitos, sendo esse efeito dependente da estabilidade do RNAm. A administração pré-operatória de glutamina pode modular a expressão de HSP70 por meio da redução dos níveis de ativação da proteína ligante do elemento de resposta ao AMP cíclico (CREB), comumente associada à resposta inflamatória exacerbada. Esse efeito é dependente da atividade da NOS-2, com consequente aumento da produção de NO.[64] Outros estudos corroboram esses fatos e compartilham mecanismos semelhantes, verificando-se também efeitos na expressão de outras HSP, como HSP25, HSP27 e HSP90.[14,63,65]

FÍGADO, GLUTAMINA HEPÁTICA E EXPRESSÃO GÊNICA

Em condições fisiológicas, a glutamina não parece ser um substrato energético importante para os hepatócitos. Porém, as concentrações plasmáticas de glutamina (500 a 750 μmol/L) são mantidas, em parte e de maneira considerável, pelo fígado. Desse modo, o fígado participa ativamente da síntese e/ou degradação de glutamina, e esses processos estão diretamente relacionados com a compartimentalização do metabolismo desse aminoácido no tecido hepático, que é dependente da região anatômica referida.[51]

O sangue que chega ao fígado pela veia porta inicialmente entra em contato com hepatócitos periportais, os quais expressam a enzima GLS e as enzimas do ciclo da ureia, que catalisam a hidrólise da glutamina para formação de glutamato, amônia e ureia, respectivamente. A amônia que escapa dessa região é captada por hepatócitos perivenosos, que contêm a enzima GS, a qual realiza a síntese de glutamina a partir de amônia e glutamato em uma reação dependente de ATP. Essa divisão de trabalho permite ao fígado funcionar como um tecido de captação ou síntese de glutamina, dependendo da necessidade global do organismo (Figura 7.8).[66]

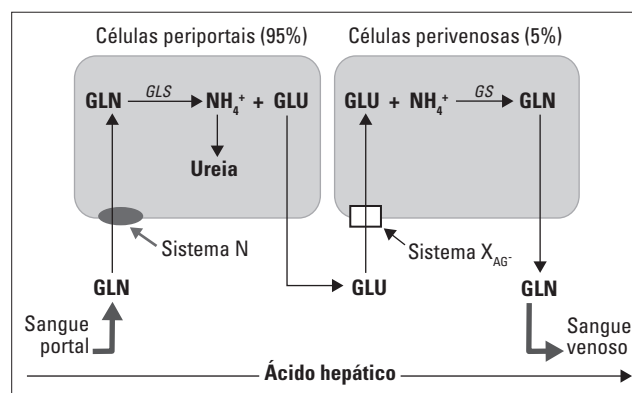



Figura 7.8 Ciclo intercelular da glutamina no fígado. Hepatócitos periportais expressam a glutaminase (GLS) e as enzimas do ciclo da ureia, e hepatócitos perivenosos expressam a enzima glutamina sintetase (GS). A glutamina é transportada ativamente para o interior do sistema hepático via sistema N e a captação de glutamato é mediada, predominantemente, pelo sistema X_{AG}-. Em células periportais, a GLS é ativada pela amônia, o que permite que essa enzima controle o fluxo relacionado ao ciclo da ureia. A GS também atua como um "sequestrador" de amônia, uma vez que converte amônia em glutamina, prevenindo, desse modo, a toxicidade da amônia. GLN: glutamina; GLU: glutamato; GS: enzima glutamina sintetase. **Fonte:** adaptada de Labow e Souba.[37]

Portanto, as enzimas GLS periportal e GS perivenosa operam simultaneamente no tecido hepático, resultando em um ciclo intercelular, com consumo de glutamina na região periportal e síntese desse aminoácido na região perivenosa, sendo o saldo destes o fator determinante do fluxo hepático de glutamina.[3,5]

No fígado, a glutamina aumenta a atividade e a expressão da enzima arginino-succinato desidrogenase, que é uma enzima importante do ciclo da ureia. A glutamina influencia a expressão e a atividade da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), uma enzima regulatória fundamental na neoglicogênese, sendo a glutamina um substrato nessa via. A baixa concentração desse aminoácido (até 5 mM) provoca redução da expressão gênica dessa enzima, enquanto 10 mM promovem aumento da expressão gênica da PEPCK em fígado perfundido de ratos.[37]

RINS

A presença da enzima GLS nos rins permite que a glutamina seja hidrolisada, gerando glutamato e amônia. A utilização de glutamina direcionada à produção de amônia nos rins inicia-se pela captação desse aminoácido por transportadores específicos localizados tanto na membrana apical quanto na membrana basolateral das células tubulares. A maior parte das reações metabólicas da glutamina nos rins ocorre nas mitocôndrias, uma vez que a enzima GLS está localizada no interior dessas organelas.[37]

A captação de glutamina pelos rins e o fluxo para o interior mitocondrial de células proximais aumentam em situações de acidose metabólica, e esse aumento está associado à grande demanda renal de glutamina para a eliminação de amônia pela urina. A amônia formada nos rins a partir da hidrólise da glutamina escapa das células dos túbulos renais por um processo de difusão passiva e se une a prótons H^+ formando íons amônio (NH_4^+). A perda de íons hidrogênio auxilia na manutenção do balanço ácido-base, que pode ser alterado em situações como jejum prolongado e exercício físico intenso e prolongado.[67]

CÉLULAS BETA PANCREÁTICAS, GLUTAMINA E EXPRESSÃO GÊNICA

Embora o pâncreas seja uma glândula composta de quatro tipos celulares com funções únicas para o organismo, as células produtoras de insulina, também chamadas de células beta pancreáticas, apresentam peculiaridades em relação ao metabolismo de aminoácidos, sobretudo da glutamina. Células beta podem metabolizar a glutamina em taxas elevadas. A via do metabolismo da glutamina nessas células é glutamina → glutamato → alfa-cetoglutarato → oxidação no ciclo de Krebs.[68]

A secreção de insulina é um processo altamente controlado e diversos fatores promovem a sua liberação para o sistema circulatório. A disponibilidade de nutrientes como carboidratos, lipídios e aminoácidos eleva o fluxo de substratos para as vias glicolíticas e o ciclo de Krebs, o que resulta em geração elevada de ATP por meio da respiração mitocondrial, seguida da fosforilação oxidativa, utilizando NADH e FADH2 como doadores de elétrons.[40] A taxa elevada ATP:ADP induz a despolarização da membrana plasmática pelo fechamento dos canais de potássio sensíveis ao ATP e, posteriormente, a abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem. O resultando desse processo estimula a liberação da insulina a partir das vesículas contendo o hormônio.[68]

Sendo consumida em taxas elevadas, a glutamina é precursora essencial para a síntese de diversas proteínas, purinas e pirimidinas em células beta. O metabolismo da glutamina leva à produção de aspartato e glutamato e, em combinação com outros aminoácidos, especialmente a leucina, induz a secreção de insulina. Isso ocorre por meio da ativação da GDH e o glutamato doa seus carbonos para o ciclo de Krebs. Como já mencionado em outras células, a síntese de glutamato a partir da glutamina também é essencial para a síntese de compostos antioxidantes, como a GSH. Por meio do ciclo de enzimas gama-glutamil, a síntese de GSH pode aumentar a proteção de células beta em situações inflamatórias crônicas, especialmente durante a progressão de diabete em associação com o excesso de peso.

Uma vez que a glutamina pode ser transaminada e ser convertida em arginina e alanina, sua redução no organismo tem efeito no metabolismo intermediário. Por sua vez, a arginina, por exemplo, é precursora do NO, essencial na sinalização de moléculas intracelulares responsáveis pela regulação do fluxo sanguíneo, pressão arterial e função de células do sistema imune. Em um estudo com indivíduos obesos e diabéticos tipo 2, a concentração de metabólitos do NO (por exemplo, nitrito e nitrato) apresentou-se reduzida quando comparada a indivíduos não diabéticos.[69] Em modelos animais, tanto na fase do pré-diabete quanto no diabete tipo 2 avançado, a concentração de glutamina em músculos predominantemente compostos de fibras oxidativas apresentava-se reduzida.[70,71]

Concomitantemente à menor disponibilidade de glutamina, no diabete melito tipo 2 (DM2) ocorre o desequilíbrio na homeostasia da glicose, caracterizada por hiperglicemia em razão da síntese elevada de glicose hepática, redução da secreção de insulina e resistência à ação da insulina em tecidos periféricos.[40] Esses efeitos são, em parte, mediados pela ação da leptina, tanto neurais quanto em tecidos periféricos.[72] Concentrações elevadas de glicose no sangue promovem estresse oxidativo pelo aumento da síntese mitocondrial de ERO, glicosilação não enzimática de proteínas e auto-oxidação da glicose.[40,73] A concentração elevada de ácidos graxos livres verificada em indivíduos com DM2 induz o desacoplamento mitocondrial[74,75] e a beta-oxidação,[74,76] aumentando a síntese de ERO.[73]

Tanto a hiperglicemia quanto a elevada concentração de ácidos graxos livres induzem a ativação de vias de sinalização por proteínas sensíveis a estresse e pró-inflamatórias, bem como a disfunção mitocondrial e sistema NAD(P)H oxidase, eventos que alteram a secreção e ação da insulina, agravando o DM2.[59,77,78] A atividade do sistema NAD(P)H oxidase, por exemplo, está envolvida com a secreção de insulina estimulada pela glicose e, agudamente, é ativada por ácidos graxos, como o palmitato e o ácido araquidônico.[79] É importante ressaltar que o ácido araquidônico é considerado um poderoso agente inflamatório envolvido com doenças metabólicas, como aterosclerose, câncer e resistência periférica à insulina. Entretanto, para células beta pancreáticas, efeitos inflamatórios desse ácido graxo considerados prejudiciais à saúde ainda não foram detectados, muito menos seus exatos mecanismos de ação.[80] Apesar disso, quando há exposição crônica, como no caso da instalação de obesidade e dislipidemias, os ácidos graxos podem promover efeitos contrários, reduzindo a secreção de insulina estimulada pela glicose, a partir do desvio do estado redox

com a elevada síntese de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2. Essas ERO são formadas pela exaustiva atividade de enzimas envolvidas no sistema NAD(P)H oxidase, como as subunidades das NOX, gp91^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} e p40^{phox}, entre outras.[77] Em longo prazo, a redução da secreção de insulina agrava gradativamente o quadro diabetogênico.

Assim como em outros tipos celulares, a glutamina exerce papel essencial na ativação da transcrição de genes e reações moleculares capazes de alterar uma variedade de funções, que no caso da célula beta envolvem a secreção de insulina. A Figura 7.9 ilustra parte das reações metabólicas da associação entre a glutamina e funções endócrinas exercidas por células beta pancreáticas. De fato, a glutamina apresenta a capacidade de modular a expressão de genes *in vitro* nessas células. A adição de 10 mM de glutamina, durante 24 horas, em comparação à concentração de 1 mM desse aminoácido resultou em aumento significativo da expressão de 148 genes, enquanto 18 foram hipoexpressos, incluindo genes envolvidos com a sinalização celular e regulação da expressão gênica da resposta secretória de insulina.[81] Além disso, a glutamina aumenta a atividade da calcineurina — fosfatase cálcio-dependente — e do fator de transcrição PDX1, o qual é essencial para a regulação transcricional do gene da insulina. De forma isolada, porém, é importante salientar que a glutamina não resulta em significativo aumento da secreção de insulina *per se*, quando comparada a outros aminoácidos ou substratos (p. ex., glicose). Por outro lado, a redução de sua disponibilidade compromete a ativação de fatores de transcrição, o que inclui o PDX1, resultando em menor síntese e liberação de insulina.[80]

Nesse contexto, é fato que a pandemia de obesidade e problemas associados, especialmente o DM2, são crescentes em todo o mundo.[82] De acordo com dados atuais da Organização Mundial da Saúde (OMS) e da Federação Internacional de Diabetes, mais de 336 milhões de pessoas apresentam quadro de DM2 em todo o mundo e, para 2030, estima-se que mais de 550 milhões de pessoas desenvolvam a doença.[83] Os maus hábitos alimentares, a urbanização, a predisposição genética, o envelhecimento e o sedentarismo contribuem para que as estimativas sejam tão elevadas.[82,84,85] Diversas são as alterações ocorridas no DM2, essencialmente relacionadas às concentrações de glicose e lipídios, bem como suas vias metabólicas envolvidas. Entretanto, pouco se conhece sobre as alterações nas concentrações de aminoácidos, metabolismo e eventuais efeitos de suplementação *in vivo*.[40] Estudos mostram que a concentração plasmática da glutamina em pacientes com diagnóstico de DM2 apresenta-se significativamente reduzida (± 20%) quando comparada a indivíduos saudáveis. Além da glutamina, aminoácidos relacionados ao metabolismo intermediário, como a arginina, também apresentam baixa concentração no plasma de indivíduos com DM2.[70,71,86]

A menor disponibilidade de glutamina compromete o sistema antioxidante mediado pela GSH, fato que culmina no processo de estresse oxidativo[87] e desvio do estado redox intracelular. Isso se dá pela razão entre as concentrações intracelulares de dissulfeto de glutationa (GSSG) e GSH (relação [GSSG]/[GSH]), no sentido da redução de GSH e aumento das quantidades de GSSG.[14,88,89] O estresse oxidativo celular promove a ativação de vias de sinalização comumente associadas ao NF-kB, o qual é ativado por uma série de fosforilações em proteínas da família MAPK, incluindo a JNK e a p38, que, quando fosforiladas tanto em resíduos de treonina quanto de serina, ativam o NF-kB.[40] O NF-κB é um fator de transcrição nuclear que está em sua forma inativa no citossol, associado à proteína inibitória IkB.[42] Quando dessassociado de seu inibidor, o NF-κB torna-se ativo e pode se translocar para o núcleo da célula, onde se liga à região regulatória de vários genes que codificam proteínas envolvidas com a inflamação e apoptose. A atividade aumentada do NF-kB está frequentemente associada a doenças, as quais incluem artrite reumatoide, esclerodermas, caquexia, sepse, câncer e DM2.[80] Cabe salientar que pacientes portadores de diabete têm elevada suscetibilidade de complicações infecciosas.[90]

Outro mecanismo que tem chamado a atenção se refere ao papel da glutamina como moduladora de proteínas chaperonas, incluindo as HSP, e sua participação na secreção de insulina. Esse mecanismo ainda não está totalmente elucidado; contudo, a ativação de uma série de proteínas e mecanismos moleculares parece ser sensível à glutamina, especialmente a via que envolve as hexosaminas (HBP). A via das HBP é responsável pela conversão de frutose-6-fosfato em glicosamina-6-fosfato, por meio da ação da enzima glutamina frutose-6-fosfato amidotransferase (GFAT). O produto final mais abundante dessa reação é a UDP-N-acetilglicosamina (UDP-GlcNAc), a qual, em conjunto com outros aminoaçúcares advindos da mesma via, é essencial para glicólise e síntese de proteínas e lipídios.

Proteínas da família das SIRT, especialmente a SIRT1, são conhecidas como sensores nutricionais e podem ser ativadas pela via das HBP, a qual modula a expressão do antígeno R humano (HUR), o qual, por sua vez, promove a estabilidade de RNAm, o que inclui a própria SIRT1 e sua expressão gênica. Por sua vez, a SIRT1 promove o aumento da expressão do HSF1, o qual se liga aos elementos de choque térmico no núcleo celular e estimula a expressão de HSP (Figura 7.9).[14,21,91] Este mecanismo pode ser particularmente importante para a secreção de insulina e

Figura 7.9 Secreção de insulina induzida por nutrientes e especial participação dos aminoácidos. Em indivíduos saudáveis, células beta respondem à presença de nutrientes secretando insulina para o sistema circulatório. Esse processo envolve a ativação da glicólise, bem como disponibilidade de energia, dada pela taxa de ATP (adenosina trifosfato)/ADP (adenosina difosfato) e de uma cascata de proteínas intracelulares, especialmente ligadas à adenosina monofosfato quinase (AMPK). Entretanto, aminoácidos, especialmente a leucina, são importantes estimulantes de síntese e secreção de insulina por meio da ativação do complexo do alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR). Esse sistema não funciona apropriadamente sem a participação da glutamina, que, por sua vez, possui papel central na síntese de proteínas de choque térmico (HSP), por meio da ativação de SIRT1 e HSF1, importantes para proteção e regulação de células beta, especialmente em situações de inflamação crônica, o que inclui o diabetes. 1,3bisPG: 1,3-bifosfatogliceraldeído; alfa-KG: alfacetoglutarato; ALA: alanina; ARG: arginina; G3P: gliceraldeído 3-fosfato; G6P: glicose 6-fosfato; GDH: glutamato desidrogenase; GLU: glutamato; GLUT 1-2: transportador de glicose 1 ou 2; GLN: glutamina; HSF1: fator de choque térmico 1; HSEs: elemento de ligação do HSF1 ao DNA; LEU: leucina; OAA: oxaloacetato; PC: piruvato carboxilase; PDX-1: fator 1 do promotor da insulina; PEP: fosfoenolpiruvato; PDH: piruvato desidrogenase; S6K1: proteína quinase S6 beta-1 ribossomal; SIRT1: sirtuína-1 deacetilase NAD-dependente.

proteção de células beta, uma vez que menor expressão de HSP70 pode ser observada em condições de obesidade associada a diabete, tendo como principais efeitos hiperglicemia, hiperinsulinemia e menor sensibilidade à insulina.[92] Além disso, a estabilidade do eixo SIRT1/HUR promovida pela glutamina também contribui para um menor estresse do retículo endoplasmático, essencial para a conversão da proinsulina em insulina. A inflamação crônica na condição da obesidade promove a instabilidade do retículo endoplasmático por meio do acúmulo de proteínas no sistema de desdobramento (UPR). Esse efeito leva ao aumento da expressão da proteína homóloga CCAAT-potenciadora de ligação (CHOP) e citocromo c oxidase IV (COX IV).[93] Em pacientes com diabete, especialmente DM2, todos esses sistemas apresentam-se em desequilíbrio, o que, em curto prazo, influencia a secreção de insulina e seu potencial. Contudo, ao longo do tempo, a evolução da doença e da inflamação pode causar a morte de células beta, agravando a doença.

Recentemente, verificou-se que a glutamina pode manter a concentração de SIRT1 e reduzir a expressão de CHOP, o que leva à hipótese de que um menor estresse de retículo endoplasmático pode ser uma tentativa de restaurar a produção de insulina.[45] De fato, os níveis de

secreção de insulina são restaurados mesmo em condições de elevado processo inflamatório extracelular. Apesar disso, mais estudos, especialmente *in vivo*, são necessários a fim de detectar se a terapia com glutamina pode ser benéfica em retardar a progressão das complicações promovidas pela instalação do diabete.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos últimos 30 anos, importantes pesquisas elucidaram as diversas funções e propriedades únicas do aminoácido mais abundante do organismo, a glutamina. Por conseguinte, identificou-se o impacto de sua deficiência em praticamente todos os tecidos, bem como sua intrínseca relação com o aumento da mortalidade, sobretudo em pacientes gravemente enfermos. A evolução dos estudos envolvendo nutrição e biologia molecular permitiu evidenciar que um grande número de vias de sinalização e genes é influenciado e regulado pela disponibilidade de glutamina no organismo, incluindo os genes responsáveis pela sua própria síntese e degradação. Mesmo diversas alternativas de suplementação, que não incluem a glutamina *per se*, dependem, de alguma forma, da concentração intracelular desse aminoácido. Claramente, a glutamina é um substrato metabólico importante, podendo modular a expressão de genes relacionados à morte e à defesa celular. Os mecanismos potenciais de ação mais estudados atualmente incluem a melhora do estado redox, por meio do sistema antioxidante, e a expressão das proteínas de choque térmico. Apesar disso, um longo caminho ainda deve ser percorrido, com ênfase em aspectos relacionados à posologia mais adequada às diferentes situações catabólicas, sejam essas agudas, crônicas ou ligadas ao exercício físico. Além disso, faz-se necessário o estudo de mecanismos em âmbito molecular, incluindo eventos pós-transcrição, e diferentes vias pós-tradução envolvidas com a regulação e a defesa celular, fato que pode revelar novos alvos moleculares para futuras intervenções terapêuticas por meio da administração de glutamina.

REFERÊNCIAS

1. Krebs HA. Metabolism of amino-acids: The synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia, and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissues. Biochem J. 1935;29:1951-69.
2. Eagle H, Oyama VI, Levy M. The growth response of mammalian cells in tissue culture to L-glutamine and L-glutamic acid. The Journal of Biological Chemistry. 1955;218:607-17.
3. Lacey JM, Wilmore DW. Is glutamine a conditionally essential amino acid? Nutrition Reviews. 1990;48:297-309.
4. Cruzat VF, Krause M, Newsholme P. Amino acid supplementation and impact on immune function in the context of exercise. J Int Soc Sports Nutr. 2014b;11:61.
5. Moskovitz B, Katz Y, Singer P et al. Glutamine metabolism and utilization: relevance to major problems in health care. Pharmacological Research: the official journal of the Italian Pharmacological Society. 1994;30:61-71.
6. Kreider RB. Dietary supplements and the promotion of muscle growth with resistance exercise. Sports Med, 1999;27:97-110.
7. Minami H, Morse EL, Adibi SA. Characteristics and mechanism of glutamine-dipeptide absorption in human intestine. Gastroenterology, 1992;103:3-11.
8. Rogero MM, Tirapegui J, Pedrosa RG, de Castro IA, Pires ISD. Effect of alanyl-glutamine supplementation on plasma and tissue glutamine concentrations in rats submitted to exhaustive exercise. Nutrition. 2006;22:564-71.
9. Young VR, Ajami AM. Glutamine: the emperor or his clothes? The Journal of Nutrition, 2001;131:2449-59.
10. Rogero MM, Tirapegui J, Pedrosa RG et al. Plasma and tissue glutamine response to acute and chronic supplementation with L-alanyl-L-glutamine rats. Nutrition Research. 2004;24:261-70.
11. Newsholme P. Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection? J Nutr. 2001;131:2515S-2522S. Discussion 2523S-2514S.
12. Nicklin P, Bergman P, Zhang B, Triantafellow E, Wang H, Nyfeler B et al. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. Cell. 2009;136:521-34.
13. Rutten EP, Engelen MP, Schols AM, Deutz NE. Skeletal muscle glutamate metabolism in health and disease: state of the art. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2005;8:41-51.
14. Cruzat VF, Pantaleao LC, Donato Jr. J, de Bittencourt Jr. PI, Tirapegui J. Oral supplementations with free and dipeptide forms of L-glutamine in endotoxemic mice: effects on muscle glutamine-glutathione axis and heat shock proteins. J Nutr Biochem. 2014c;25:345-52.
15. Roth E, Funovics J, Muhlbacher F, Schemper M, Mauritz W, Sporn P et al. Metabolic disorders in severe abdominal sepsis: glutamine deficiency in skeletal muscle. Clin Nutr. 1982;1:25-41.
16. Rogero MM, Tirapegui J, Vinolo MAR, Borges MC, de Castro IA, Pires ISDO et al. Dietary glutamine supplementation increases the activity of peritoneal macrophages and hemopoiesis in early-weaned mice inoculated with Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin. Journal of Nutrition. 2008;138:1343-48.
17. Wang Y, Jiang ZM, Nolan MT, Jiang H, Han HR, Yu K et al. The impact of glutamine dipeptide-supplemented parenteral nutrition on outcomes of surgical patients: a meta-analysis of randomized clinical trials. JPEN J Parenter Enteral Nutr. 2010;34:521-29.
18. Flaring UB, Rooyackers OE, Wernerman J, Hammarqvist F. Glutamine attenuates post-traumatic glutathione depletion in human muscle. Clin Sci (Lond). 2003;104:275-82.
19. Cruzat VF, Tirapegui J. Effects of oral supplementation with glutamine and alanyl-glutamine on glutamine, glutamate, and glutathione status in trained rats and subjected to long-duration exercise. Nutrition. 2009;25:428-35.
20. Rogero MM, Tirapegui J. Aspectos nutricionais sobre glutamina e exercício físico. Nutrire, 2003;25:87-112.
21. Petry ER, Cruzat VF, Heck TG, Leite JS, Homem de Bittencourt Jr PI, Tirapegui J. Alanyl-glutamine and glutamine plus alanine supplements improve skeletal redox status in trained rats: Involvement of heat shock protein pathways. Life Sci. 2014;94:130-36.
22. Hiscock N, Pedersen BK. Exercise-induced immunodepression – plasma glutamine is not the link. Journal of Applied Physiology. 2002;93:813-22.
23. Newsholme P, Abdulkader F, Rebelato E, Romanatto T, Pinheiro CH, Vitzel KF et al. Amino acids and diabetes: implications

for endocrine, metabolic and immune function. Front Biosci. 2011;16:315-39.
24. Herzog B, Frey B, Pogan K, et al. In vitro peptidase activity of rat mucosa cell fractions against glutamine-containing dipeptides. Journal of Nutrition Biochemistry, 1996;7:135-41.
25. Walsh NP, Blannin AK, Robson PJ, et al. Glutamine, exercise and immune function: links and possible mechanisms. Sports Medicine, set. 1998;26:177-91.
26. Rogero MM, Tirapegui J. Aspectos atuais sobre glutamina, atividade física e sistema imune. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. 2000;36:201-12.
27. Tirapegui J, Cruzat V. Glutamine and skeletal muscle. In: Rajendram R, Preedy VR, Patel VB. Glutamine in clinical nutrition. New York: Springer; 2015.
28. Rowbottom DG, Keast D, Morton AR. The emerging role of glutamine as an indicator of exercise stress and overtraining. Sports Med, 1996;21:80-97.
29. Koyama K, Kaya M, Tsujita J, Hori S. Effects of decrease plasma glutamine concentrations on peripheral lymphocyte proliferation in rats. Eur J Appl Physiol, 1998;77:25-31.
30. Wagenmakers AJM. Muscle amino acid metabolism at rest and during exercise: role in human physiology and metabolism. Exercise and Sport Science Review. 1998;26:287-314.
31. Goldberg AL, Chang TW. Regulation and significance of amino acid metabolism in skeletal muscle. Federation Proceedings. 1978;37:2301-07.
32. Nieman DC, Pedersen BK. Exercise and immune function. Sports Medicine. 1999;27:73-80.
33. Hood DA, Terjung RL. Endurance training alters alanine and glutamine release from muscle during contractions. FEBS Letters. 1994;340:287-90.
34. Antonio J, Street C. Glutamine: a potentially useful supplement for athletes. Can J Appl Physiol. 1999;24:1-14.
35. Austgen TR, Chakrabarti R, Chen MK, Souba WW. Adaptive regulation in skeletal muscle glutamine metabolism in endotoxin-treated rats. J Trauma. 1992;32:600-606.
36. Anderson PM, Broderius MA, Fong KC, Tsui KN, Chew SF & Ip YK 2002 Glutamine synthetase expression in liver, muscle, stomach and intestine of Bostrichthys sinensis in response to exposure to a high exogenous ammonia concentration. J Exp Biol 205:2053-2065.
37. Labow BI, Souba WW. Glutamine. World Journal of Surgery. 2000;24:1503-13.
38. Labow BI, Souba WW, Abcouwer SF. Glutamine synthetase expression in muscle is regulated by transcriptional and posttranscriptional mechanisms. American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism. 1999;276:E1136-E1145.
39. Xia Y, Wen HY, Young ME, Guthrie PH, Taegtmeyer H, Kellems RE. Mammalian target of rapamycin and protein kinase A signaling mediate the cardiac transcriptional response to glutamine. J Biol Chem. 2003;278:13143-50.
40. Newsholme P, Cruzat V, Arfuso F, Keane K. Nutrient regulation of insulin secretion and action. J Endocrinol. 2014;221:R105-20.
41. Galley HF. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. Br J Anaesth. 2011;107:57-64.
42. Cruzat VF, Bittencourt A, Scomazzon SP, Leite JS, de Bittencourt Jr. PI, Tirapegui J. Oral free and dipeptide forms of glutamine supplementation attenuate oxidative stress and inflammation induced by endotoxemia. Nutrition. 2014a;30:602-11.
43. Souba WW. Intestinal glutamine metabolism and nutrition. The Journal of Nutritional Biochemistry. 1993;4:2-9.
44. Souba WW, Herskowitz K, Salloum RM, et al. Gut glutamine metabolism. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition, 1990;14:45-50.
45. Cruzat VF, Keane KN, Scheinpflug AL, Cordeiro R, Soares MJ, Newsholme P. Alanyl-glutamine improves pancreatic beta-cell function following ex vivo inflammatory challenge. J Endocrinol. 2015;224;261-71.
46. Yi D, Hou Y, Wang L, Ouyang W, Long M, Zhao D et al. L-glutamine enhances enterocyte growth via activation of the mTOR signaling pathway independently of AMPK. Amino Acids. 2015;47:65-78.
47. Sziksz E, Veres G, Vannay A, Prokai A, Gal K, Onody A et al. Increased heat shock protein 72 expression in celiac disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2010;51:573-78.
48. Pedersen BK, Hoffman-Goetz L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. Physiol Rev. 2000 Jul;80(3):1055-81.
49. Newsholme EA, Newsholme P, Curi R. The role of the citric acid cycle in cells of the immune system and its importance in sepsis, trauma and burns. Biochem Soc Symp. 1987;54:145-62.
50. Curi R, Newsholme P, Newsholme EA. Intracellular-distribution of some enzymes of the glutamine utilization pathway in rat lymphocytes. Biochem Biophys Res Commun. 1986;138:318-22.
51. Curi R. Glutamina: metabolismo e aplicações clínicas e no esporte. Rio de Janeiro: Sprint; 2000. 264p.
52. Branzk N, Lubojemska A, Hardison SE, Wang Q, Gutierrez MG, Brown GD, Papayannopoulos V. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. Nat Immunol. 2014;15:1017-25.
53. Calder PC. Fuel utilization by cells of the immune system. Proceedings of the Nutrition Society. 1995;54:65-82.
54. Yaqoob P, Calder PC. Glutamine requirement of proliferating T lymphocytes. Nutrition. 1997;13:646-51.
55. Parry-Billings M, Leighton B, Dimitriadis G, de Vasconcelos PR, Newsholme EA. Skeletal muscle glutamine metabolism during sepsis in the rat. The International Journal of Biochemistry. 1989;21:419-23.
56. Sarantos P, Ockert K, Souba WW. Endotoxin stimulates lymphocyte glutaminase expression. Arch Surg. 1993;128:920-24.
57. Garcia C, Pithon-Curi TC, de Lourdes Firmano M, Pires de Melo M, Newsholme P, Curi R. Effects of adrenaline on glucose and glutamine metabolism and superoxide production by rat neutrophils. Clin Sci (Lond). 1999;96:549-55.
58. Pithon-Curi TC, Levada AC, Lopes LR, Doi SQ, Curi R. Glutamine plays a role in superoxide production and the expression of p47(phox), p22(phox) and gp91(phox) in rat neutrophils. Clin Sci (Lond). 2002;103:403-08.
59. Newsholme P, Rebelato E, Abdulkader F, Krause M, Carpinelli A, Curi R. Reactive oxygen and nitrogen species generation, antioxidant defenses, and beta-cell function: a critical role for amino acids. J Endocrinol. 2012;214:11-20.
60. Singleton KD, Beckey VE, Wischmeyer PE. Glutamine prevents activation of NF-kappab and stress kinase pathways, attenuates inflammatory cytokine release, and prevents acute respiratory distress syndrome (Ards) following sepsis. Shock. 2005a;24:583-89.
61. Rhoads JM, Argenzio RA, Chen W, Rippe RA, Westwick JK, Cox AD et al. L-glutamine stimulates intestinal cell proliferation and activates mitogen-activated protein kinases. American Journal of Physiology. 1997;272:G943-953.

62. Curi R, Lagranha CJ, Doi SQ, Sellitti DF, Procopio J, Pithon-Curi TC et al. Molecular mechanisms of glutamine action. J Cell Physiol. 2005;204:392-401.
63. Petry ER, Cruzat VF, Heck TG, Homem de Bittencourt Jr PI, Tirapegui J. L-glutamine supplementations enhance liver glutamine-glutathione axis and heat shock factor-1 expression in endurance-exercise trained rats. Int J Sport Nutr Exerc Metab. 2015;25:188-97.
64. Hayashi Y, Sawa Y, Fukuyama N, Nakazawa H, Matsuda H. Preoperative glutamine administration induces heat-shock protein 70 expression and attenuates cardiopulmonary bypass-induced inflammatory response by regulating nitric oxide synthase activity. Circulation. 2002;106:2601-07.
65. Singleton KD, Serkova N, Beckey VE, Wischmeyer PE. Glutamine attenuates lung injury and improves survival after sepsis: role of enhanced heat shock protein expression. Crit Care Med. 2005b;33:1206-13.
66. Smith RJ. Glutamine metabolism and its physiologic importance. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition. 1990;14:40-44.
67. Smith DJ, Norris SR. Changes in glutamine and glutamate concentrations for tracking training tolerance. Medicine and Science in Sports and Exercise. 2000;32:684-89.
68. Komatsu M, Takei M, Ishii H, Sato Y. Glucose-stimulated insulin secretion: A newer perspective. J Diabetes Investig. 2013;4:511-16.
69. Krause M, Rodrigues-Krause J, O'Hagan C, De Vito G, Boreham C, Susta D et al. Differential nitric oxide levels in the blood and skeletal muscle of type 2 diabetic subjects may be consequence of adiposity: a preliminary study. Metabolism. 2012;61:1528-37.
70. Wijekoon EP, Skinner C, Brosnan ME, Brosnan JT. Amino acid metabolism in the Zucker diabetic fatty rat: effects of insulin resistance and of type 2 diabetes. Can J Physiol Pharmacol. 2004;82:506-14.
71. Etgen GJ, Oldham BA. Profiling of Zucker diabetic fatty rats in their progression to the overt diabetic state. Metabolism. 2000;49:684-88.
72. Berglund ED, Vianna CR, Donato Jr. J, Kim MH, Chuang JC, Lee CE et al. Direct leptin action on POMC neurons regulates glucose homeostasis and hepatic insulin sensitivity in mice. Journal of Clinical Investigation. 2012;122:1000-09.
73. Elahy M, Baindur-Hudson S, Cruzat VF, Newsholme P, Dass CR. Mechanisms of PEDF-mediated protection against reactive oxygen species damage in diabetic retinopathy and neuropathy. Journal of Endocrinology. 2014;222:R129-R139.
74. Hahn WS, Kuzmicic J, Burrill JS, Donoghue MA, Foncea R, Jensen MD et al. Proinflammatory cytokines differentially regulate adipocyte mitochondrial metabolism, oxidative stress, and dynamics. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2014;306:E1033-45.
75. Krause M, Keane K, Rodrigues-Krause J, Crognale D, Egan B, De Vito G et al. Elevated levels of extracellular heat-shock protein 72 (eHSP72) are positively correlated with insulin resistance in vivo and cause pancreatic beta-cell dysfunction and death in vitro. Clin Sci (Lond). 2014;126:739-52.
76. Akude E, Zherebitskaya E, Chowdhury SK, Smith DR, Dobrowsky RT, Fernyhough P. Diminished superoxide generation is associated with respiratory chain dysfunction and changes in the mitochondrial proteome of sensory neurons from diabetic rats. Diabetes. 2011;60:288-297.
77. Newsholme P, Morgan D, Rebelato E, Oliveira-Emilio HC, Procopio J, Curi R et al. Insights into the critical role of NADPH oxidase(s) in the normal and dysregulated pancreatic beta cell. Diabetologia. 2009;52:2489-98.
78. Morgan D, Oliveira-Emilio HR, Keane D, Hirata AE, Santos da Rocha M, Bordin S et al. Glucose, palmitate and pro-inflammatory cytokines modulate production and activity of a phagocyte-like NADPH oxidase in rat pancreatic islets and a clonal beta cell line. Diabetologia. 2007;50:359-69.
79. Graciano MF, Valle MM, Curi R, Carpinelli AR. Evidence for the involvement of GPR40 and NADPH oxidase in palmitic acid-induced superoxide production and insulin secretion. Islets. 2013;5:139-48.
80. Keane KN, Cruzat VF, Carlessi R, de Bittencourt PIH, Newsholme P. Molecular events linking oxidative stress and inflammation to insulin resistance and βCell Dysfunction. Oxid Med Cell Longev. 2015(2015):15.
81. Corless M, Kiely A, McClenaghan NH, Flatt PR, Newsholme P. Glutamine regulates expression of key transcription factor, signal transduction, metabolic gene, and protein expression in a clonal pancreatic beta-cell line. J Endocrinol. 2006;190:719-27.
82. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. Diabetes Care. 1998;21:1414-31.
83. Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. Diabetes Res Clin Pract. 2011;94:311-21.
84. Guariguata L, Whiting D, Weil C, Unwin N. The International Diabetes Federation diabetes atlas methodology for estimating global and national prevalence of diabetes in adults. Diabetes Res Clin Pract. 2011;94:322-32.
85. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care. 2004;27:1047-53.
86. Menge BA, Schrader H, Ritter PR, Ellrichmann M, Uhl W, Schmidt WE et al. Selective amino acid deficiency in patients with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. Regul Pept. 2010;160:75-80.
87. Cruzat VF, Rogero MM, Ou AK, Pires ISO, Tirapegui J. Effect of alanyl-glutamine supplementation on muscle damage in rats submitted to exhaustive exercise. Annals of Nutrition and Metabolism. 2007;51:386-87.
88. Cruzat VF, Petry ER, Tirapegui J. Glutamine: biochemical, metabolic, molecular aspects and supplementation. Revista Brasileira de Medicina do Esporte. 2009;15:392-97.
89. Rodas PC, Rooyackers O, Hebert C, Norberg A, Wernerman J. Glutamine and glutathione at ICU admission in relation to outcome. Clin Sci (Lond). 2012;122:591-97.
90. Araki E, Nishikawa T. Oxidative stress: a cause and therapeutic target of diabetic complications. J Diabetes Investig. 2010;1:90-96.
91. Kotas ME, Gorecki MC, Gillum MP. Sirtuin-1 is a nutrient-dependent modulator of inflammation. Adipocyte. 2013;2:113-18.
92. Chung J, Nguyen AK, Henstridge DC, Holmes AG, Chan MH, Mesa JL et al. HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. Proc Natl Acad Sci USA. 2008;105:1739-44.
93. Marhfour I, Lopez XM, Lefkaditis D, Salmon I, Allagnat F, Richardson SJ et al. Expression of endoplasmic reticulum stress markers in the islets of patients with type 1 diabetes. Diabetologia. 2012;55:2417-20.

8 Leucina

Francisco Leonardo Torres-Leal

INTRODUÇÃO

A leucina é um dos nove aminoácidos essenciais (AAE), ou seja, ela não é produzida pelo corpo humano e deve ser obtida por meio de fontes alimentares. Suas concentrações livres nos compartimentos plasmáticos, hepáticos e musculares são da ordem de 110, 300 e 240 μmol/L, respectivamente. A leucina é um aminoácido de cadeia ramificada (ACR), e ganha destaque por ser um nutriente importante, capaz de aumentar a sinalização do complexo 1 da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTORC1) em muitos tecidos (músculo esquelético, tecido adiposo, fígado, ilhotas pancreáticas e hipotálamo) e a secreção de insulina nas células beta pancreáticas. Além disso, a leucina é capaz de regular a saciedade, o gasto energético (peso corporal) e a homeostase glicêmica por meio de mecanismos centrais e periféricos.[1-6]

Entre os ACR, a leucina em particular é o ativador mais potente da síntese proteica e inibidor da proteólise, capaz de estimular um fenótipo anabólico às fibras musculares. Esse aminoácido desempenha papel significativo no ganho e na manutenção da massa muscular e é considerado um fármaco-nutriente com ações diretas nos tecidos periféricos. Os ACR respondem aproximadamente 20% do consumo proteico, ao passo que representam aproximadamente um terço da proteína muscular.[7]

Portanto, a leucina parece ser capaz de desempenhar os efeitos mais importantes na regulação do *turnover* proteico em comparação aos demais aminoácidos. Existem ainda fortes evidências de que a leucina reprima a degradação proteossomal e aumente a sinalização da via do mTORC1, induzindo a promoção do crescimento celular.[8,9]

Apesar da existência de inúmeros trabalhos descrevendo o aumento da atividade do mTORC1 mediada por fatores de crescimento, o mecanismo celular que sustenta a maior ativação do mTORC1 mediada por leucina permanece indefinido. Ainda não está claro como as células são sensíveis a esse aminoácido e como esse sinal é transduzido para o mTORC1. No entanto, apesar das poucas evidências, este capítulo abordará o efeito importante desempenhado por esse aminoácido na sinalização do mTORC1.

REGULAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES INTRACELULARES DE AMINOÁCIDOS

As concentrações intracelulares de aminoácidos são determinadas pelo equilíbrio entre ingestão, absorção, reabsorção e utilização celular. Para manter as reservas intracelulares de aminoácidos, os mecanismos dependentes e independentes de mTORC1 são estimulados a suprimir a síntese de proteínas.[10,11]

A recuperação dos estoques intracelulares de aminoácidos pode ser demonstrada em nível celular, no qual agentes que inibem a síntese de proteínas favorecem esse processo. Por exemplo, quando a etapa de elongação (durante a tradução) é bloqueada por meio da administração de cicloeximida (uma toxina produzida por bactérias que interfere de maneira reversível na translocação ribossômica), as reservas de aminoácidos intracelulares são rapidamente aumentadas. O aumento nas reservas de aminoácidos durante o tratamento com cicloeximida resulta em potente ativação do mTORC1, apesar da ausência de suprimento externo de aminoácidos ou de fatores de crescimento.[12] É notável que o tratamento com cicloeximida também suprime a expressão do repressor (REDD1) do

mTORC1, contribuindo, nesse contexto, para a ativação do complexo.[10]

CAPTAÇÃO CELULAR E TRANSPORTADORES DE AMINOÁCIDOS

Transportadores de aminoácidos na membrana plasmática

As células musculares, em especial, exigem oferta abundante de aminoácidos para maximizar o crescimento muscular. A homeostase intracelular de aminoácidos é mantida pelo fornecimento externo (isto é, a ingestão de aminoácidos via alimentação ou suplementação) e pela taxa de captação de aminoácidos a partir do sangue. A captação de aminoácidos é tipicamente associada com cotransporte de íons, como Na^+ (também K^+ ou Cl^-). O transporte de Na^+ e K^+ é descrito como sendo dependente de energia, por meio da bomba Na^+/K^+-ATPase, localizada na membrana plasmática que mantém o gradiente desses íons (Figura 8.1).[13] Existem muitos sistemas de transporte que regulam o fornecimento de aminoácidos. Os principais sistemas de sinalização que influenciam o mTORC1 são os sistemas de transporte L e A.

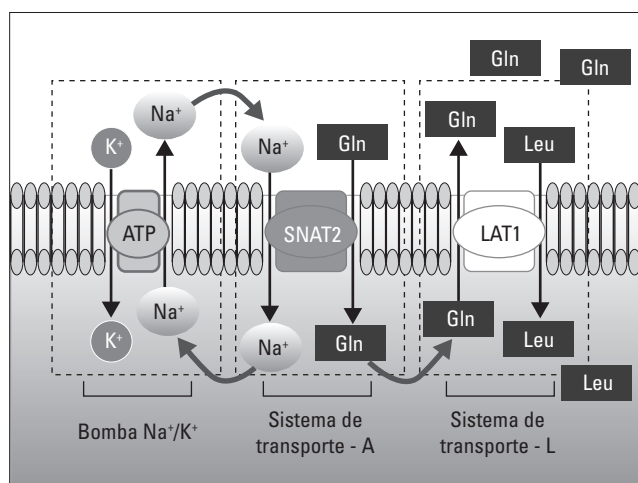



Figura 8.1 Sistema de captação de leucina intracelular. ATP: adenosina trifosfato; Gln: glutamina; K^+: potássio; LAT1: transportador 1 de aminoácidos do tipo L; Leu: leucina; Na^+: sódio; SNAT2: transportador 2 de aminoácidos neutro ligado ao Na^+. **Fonte:** Souba e Pacitti.[13]

Os transportadores do tipo L são permutadores de aminoácidos que funcionam principalmente para importar os ACR em troca de outros aminoácidos intracelulares. O transportador 1 de aminoácidos do tipo L (LAT1) é ligado à glicoproteína CD98, bem como o transportador 2 de aminoácidos neutros é ligado ao Na^+ (SNAT2), e ambos têm aumento da expressão e da correlação com a atividade de mTORC1.[14,15] Apesar da presença de alguns transportadores diferentes para a glutamina, o SNAT2 regula as concentrações desse aminoácido predominantemente no músculo esquelético,[16-18] onde ela é encontrada em abundância.[19] O SNAT2 tem como função mediar a captação de pequenos aminoácidos neutros, especificamente a glutamina. Sobre as funções desses transportadores, pode-se destacar que o LAT1 exporta a glutamina em troca da importação de leucina. Já o SNAT2 mantém as concentrações intracelulares de glutamina, as quais, por sua vez, são redirecionadas ao trocador de aminoácidos LAT1/CD98 e promovem a captação de leucina.[20]

Quando a expressão de SNAT2 em células musculares foi silenciada, observou-se redução significativa das concentrações intracelulares de leucina e de glutamina, indicando a dependência da importação de glutamina por SNAT2.[21] Como consequência, o *knockdown* de SNAT2 também foi seguido de significativa repressão na sinalização do mTORC1. De forma semelhante ao que acontece com o SNAT2, foi demonstrado em células HeLa que o SLC1A5 – um transportador de aminoácidos neutros de alta afinidade abundantemente expresso nessas células –, além de atuar em conjunto com o permutador de aminoácidos LAT1/CD98, é necessário para a atividade de mTORC1 quando estimulado com leucina. Nesse estudo, o *knockdown* do sistema ASC (SLC1A5) ou LAT1/CD98 (SLC7A5/SLC3A2) também foi suficiente para suprimir o mTORC1 e ativar a autofagia por meio da redução da captação de glutamina.[22]

Assim como o transporte celular de aminoácidos, evidências recentes indicam que alguns transportadores podem também estar envolvidos na transdução de sinal, agindo como verdadeiros receptores de membrana celular, conhecidos como *transceptores*. O SNAT2 pode ter funções adicionais como transceptor, visto que seu *knockdown* causa repressão da sinalização da insulina por meio da fosfatidil inositol 3 quinase (PI3K). Para analisar melhor essa função do SNAT2 na transdução de sinal, pesquisadores o saturaram com um substrato sintético – o metil-amino-isobutirato (MeAIB). O tratamento aumentou a atividade de PI3K/AKT, apesar de reduzir o transporte intracelular de aminoácidos. Isso indica que o SNAT2, quando ativo, pode favorecer a transdução de sinal de PI3K, independentemente da sua capacidade de transporte de aminoácidos, e pode ativar o mTORC1 por meio de alterações no *pool* intracelular de aminoácidos. Essa evidência sugere que a função do SNAT2 vai além do transporte de aminoácidos, incluindo a retransmissão de sinais provenientes desses nutrientes para o mTORC1.[21]

Sensores de aminoácidos citosólicos

O aumento das concentrações intracelulares de aminoácidos promove a translocação do mTORC1 via Rag do citosol para a superfície lisossômica (Figura 8.2). Os aminoácidos neutros e grandes (p. ex., leucina, isoleucina, valina, fenilalanina e triptofano), juntamente com a glutamina e a arginina, são estimulantes chave da ativação do mTORC1. A leucina é particularmente o mais potente e o mais utilizado como exemplo para descrever a ativação do mTORC1 dependente de aminoácidos.[23] Vários sensores de aminoácidos citosólicos têm sido inferidos como verdadeiros ativadores de mTORC1,[24,25] alguns dos quais são capazes de ligar-se diretamente a aminoácidos (p. ex., a leucina), como o sensor leucil-tRNA sintetase (LRS), a glutamato desidrogenase (GDH) e as UBR1-2 (ubiquitinas ligases E3 que reconhecem a identidade de resíduos N-terminais e contribuem para a seletiva desestabilização de proteínas-alvo, de acordo com os resíduos N-terminais). Quando se liga à leucina, a LRS atua como uma proteína de ativação de GTPase (GAP) para heterodímeros RagD e ajuda a ancorar as proteínas Rag na membrana lisossômica.[25] Existem algumas evidências de que a glutamina e a leucina podem estimular, de modo distinto, a ativação completa do mTORC1;[26,27] além disso, a privação de glutamina pode reduzir a atividade do mTORC1 sem diminuir a concentração de leucina intracelular.[22] A leucina também pode ativar a enzima GDH, estimulando a glutaminólise e a formação de alfa-cetoglutarato, que, por meio da ação da hidroxilase prolil, pode promover a formação de GTP RagB e o recrutamento do mTORC1 para o lisossomo.[27]

SINALIZAÇÃO DO mTORC1 PELA LEUCINA

Regulação *upstream*

As células corporais precisam integrar informações a partir do ambiente para garantir que apenas cresçam quando as condições forem favoráveis. O mTOR é uma proteína quinase Ser/Thr altamente conservada, que é considerada um sensor chave de estímulos ambientais, incluindo a biodisponibilidade de fatores de crescimento e nutrientes, bem como de estresse. Em condições de fartura de nutrientes, o mTOR promove o crescimento celular, estimulando a síntese proteica e inibindo o catabolismo celular, por exemplo, por meio da repressão da via de autofagia. Portanto, a compreensão de como os diferentes estímulos são detectados e como eles sinalizam para o mTOR é parte integrante da elucidação de como a célula ou o organismo cresce.

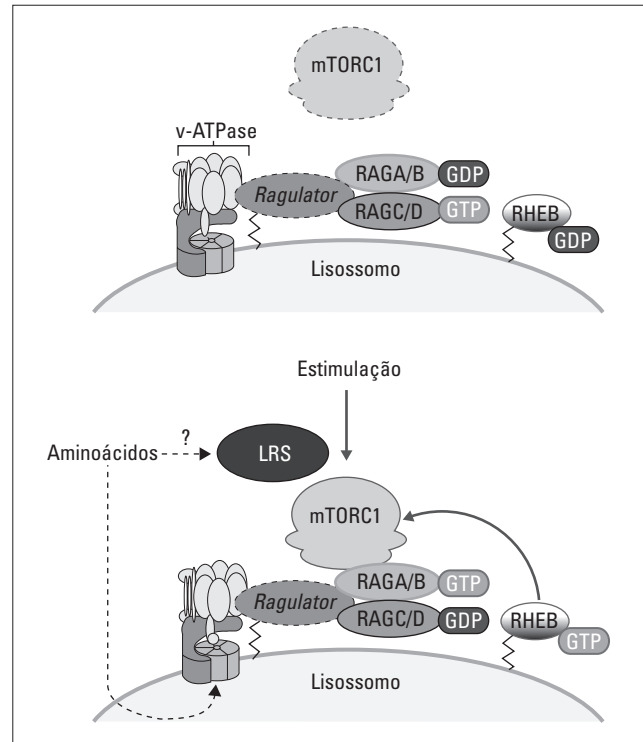



Figura 8.2 Ativação de sensores Rag no citosol.

O mTOR é parte de um complexo conhecido como mTORC1, compreendendo:

- Proteína do mTOR associada ao domínio regulatório (RAPTOR), que ajuda no reconhecimento do substrato.
- Substrato da AKT rico em prolina de 40kDa (PRAS40; também conhecido como AKT1S1) e proteína contendo domínio DEP, que interage com o mTOR, ambos reguladores negativos do mTORC1.
- *Mammalian lethal with* SEC13 *protein* 8 (mLST8, também conhecida como GβL), que regula positivamente o mTORC1.

São conhecidos alguns estímulos ativadores de mTORC1, como fatores de crescimento e sinais oriundos do complexo esclerosa-tuberosa (TSC, compreendendo o TSC1 e o TSC2) (Figura 8.3). A TSC é uma proteína que regula negativamente o mTORC1, por promover a hidrólise de RHEB-GTP, convertendo a RHEB em seu estado inativo ligada ao GDP. Como resposta, a inibição da TSC por fatores de crescimento dá origem a RHEB ligada ao GTP, que é um ativador potente da atividade de quinase do mTORC1.[28,29] O mTORC1 é inibido direta e indiretamente por meio da fosforilação de RAPTOR e TSC2, respectivamente, e pela proteína quinase ativada pelo AMP (AMPK), em resposta ao baixo *status* energético celular.[30,31]

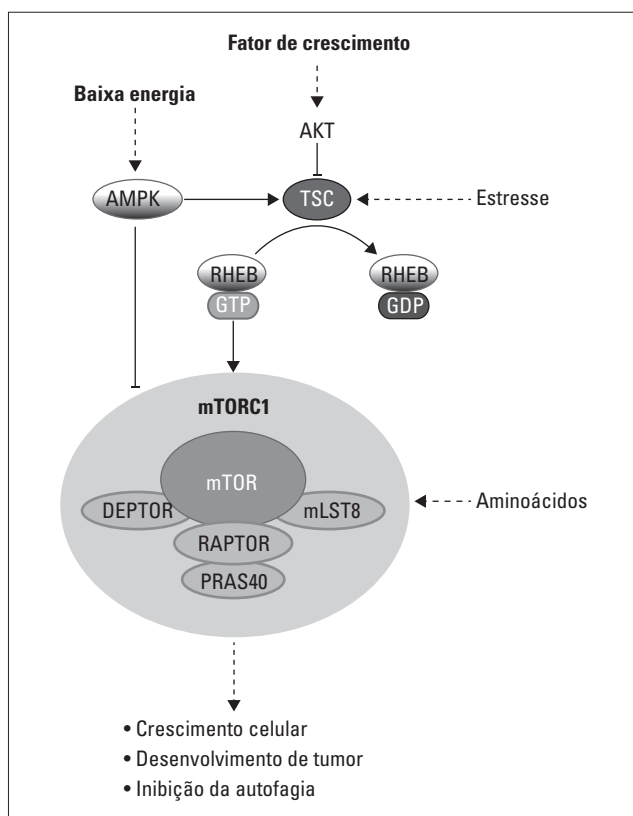



Figura 8.3 Via de sinalização do mTORC1.

Ao contrário dos outros estímulos, os aminoácidos não realizam seus efeitos na via TSC-RHEB. Também não está claro como a presença ou a ausência de leucina dentro da célula é capaz de modular a atividade do mTORC1. Parece que os aminoácidos são os sinais mais importantes para a ativação do mTORC1, haja vista que os fatores de crescimento não podem ativar eficientemente o mTORC1 quando as concentrações de aminoácidos são limitadas.[32-34] Embora a leucina,[32,33] a glutamina e a arginina[22,27,34-37] sejam consideradas ativadoras de mTORC1, atualmente é incerto como as células corporais são sensíveis a aminoácidos específicos, capazes de ativar o mTORC1. Além disso, permanece incerto como os aminoácidos são primeiramente detectados, embora alguns estudos mostrem que componentes presentes na superfície do lisossomo funcionam como verdadeiros sensores de aminoácidos.

Sensor de aminoácidos nos lisossomos

O RHEB é necessário para ativação do mTORC1 por todos os estímulos, incluindo aminoácidos. No entanto, verifica-se que fibroblastos embrionários de camundongo (MEF) sem TSC2 ainda são sensíveis ao estímulo de aminoácidos, indicando que outros componentes, que não são parte da via TSC-RHEB, provavelmente estejam envolvidos nesse processo (Figura 8.3).[38,39] A descoberta de pequenos Rag GTPase em células de mamíferos, que apresentam quatro Rag (RagA a RagD), foi considerada um avanço importante na compreensão de como os aminoácidos sinalizam o mTORC1.[11,32] A Rag GTPase pertence a uma superfamília de Ras que, ao sofrer dimerização, é considerada um importante ativador de mTORC1.[11,32]

Como em outras pequenas GTPases, o estado de ativação das Rag GTPases é refletido pelo seu estado de nucleotídeo guanina, sendo esta regulada por leucina. Especificamente, a presença de leucina promove a formação de um complexo ativo de configuração do tipo RagA/B•GTP–RagC/D•GDP. Na ausência desse aminoácido, um complexo inativo RagA/B•GDP–RagC/D•GTP é formado (ver Figura 8.2).

Sob condições suficientes de leucina, o complexo ativo RagA/B•GTP–RagC/D•GDP tem mostrado ligar-se diretamente ao RAPTOR, que é componente do mTORC1 e, em seguida, o mTORC1 é redistribuído para o lisossomo. Curiosamente, o mTORC1 encontra-se disperso no citoplasma sob condições de escassez de leucina, mas é redistribuído para vesículas contendo proteína 2 de membrana associada ao lisossomo (LAMP2) e RAB7 (que são marcadores de lisossomos e endossomos tardios, respectivamente), em resposta ao estímulo com leucina.[32,40] Essas evidências sugerem que as Rag GTPases apresentam efeito importante na transdução de sinais de aminoácidos para o mTORC1. Além dessas evidências, existe outra possibilidade de ativação do mTORC1, que é por meio de sua realocação para o lisossomo, em resposta à presença de leucina, mesmo quando as Rag GTPases estão ausentes.[32,40] Essa realocação tem sido proposta para promover a interação de mTORC1 com RHEB, o qual será direcionado e ancorado ao lisossomo pelo seu C-terminal com motivo CaminoácidosX,[32,40] levando à ativação do mTORC1 por um mecanismo desconhecido. No entanto, essa evidência tem sido bastante questionada por motivos metodológicos, sugerindo que a resposta seja motivada por um processo evolutivo em organismos no qual existe a sinalização por fatores de crescimento, em razão da notória regulação do mTORC1 por RHEB (Figura 8.3).[41]

O estado de ligação dos nucleotídeos das Rag é crucial para a ativação do mTORC1. A condição de escassez de leucina, acompanhada da superativação de RagA/B•GTP, é suficientemente capaz de ativar o mTORC1, indicando que o estado de ligação dos nucleotídeos em RagA/B, em vez de RagC/D, regula principalmente a ativação de mTORC1.[42,43] No entanto, a coexpressão de RagC/D aumenta esses efeitos, em parte porque a RagC/D estabiliza a RagA/B. Além disso, quando o complexo RagA/B•GDP–RagC/D•GTP encontra-se inativado, ele não responde na presença de leucina, redu-

zindo, desse modo, a atividade do mTORC1, mesmo sob quantidades suficientes desse aminoácido.[11,32] Essas evidências revelam que a presença de leucina controla o recrutamento do mTORC1 para o lisossomo e, assim, sua ativação. Esse mecanismo sugere um modelo pelo qual o mTORC1 é sensível a múltiplos estímulos no lisossomo, como aminoácidos, via Rag GTPases, e fatores de crescimento, via RHEB; aminoácidos e fatores de crescimento parecem convergir no lisossomo, a fim de ativar o mTORC1.

Essa interação resulta na translocação do mTORC1 do citoplasma para a superfície do lisossomo, onde as Rag GTPases encaixam-se em um complexo multissubunidade chamado *ragulator*.[40] Semelhantemente à GTPase, o *ragulator* é essencial para a ativação do mTORC1 por aminoácidos (leucina).

Algumas dúvidas persistem sobre a ativação do mTORC1, principalmente em relação ao mecanismo pelo qual ele é ativado somente quando chega à superfície do lisossomo. Atualmente, o que se sabe é que, na superfície lisossômica, o mTORC1 pode ligar-se e tornar-se ativado por RHEB, que é encontrado em todo o sistema conhecido como endomembrana. Assim, Rag e RHEB GTPases são parte do complexo molecular: o RHEB associado ao GTP apenas interage com o mTORC1 quando o mecanismo sensível à leucina Rag-*ragulator* leva-o à superfície lisossômica, assegurando que a ativação do mTORC1 ocorra apenas se os aminoácidos (leucina) estiverem biodisponíveis, independentemente da presença de outros sinais positivos, como o fator de crescimento.[28]

A Rag GTPase e o *ragulator* localizam-se na superfície do lisossomo, mas não em outras endomembranas, onde o RHEB também ocorre, sugerindo papel importante para essa organela: o de sensor de aminoácidos via mTORC1. Um trabalho recente propôs modelo de transporte do sensor de aminoácidos em que estes se acumulam no lúmen do lisossomo e iniciam a sinalização por meio de um mecanismo dependente do H^+-adenosina trifosfato ATPase vacuolar (v-ATPase).[29] A depleção de subtipos de v-ATPase bloqueia a sinalização do mTORC1 para a superfície lisossômica e a transdução desse sinal, quando ativado por leucina. O v-ATPase interage diretamente com o *ragulator*, proporcionando ligação física entre a v-ATPase e a Rag GTPase na superfície do lisossomo (Figura 8.4). A atividade ATPase da v-ATPase parece ser essencial para retransmitir o sinal de aminoácidos a partir do lúmen do lisossomo para a Rag GTPase e o *ragulator*; porém, a maneira exata como a v-ATPase realiza essas funções ainda permanece incerta. Curiosamente, a via mTORC1 regula a expressão de v-ATPase, sugerindo que existe um ciclo de *feedback* entre mTORC1 e a função lisossômica.[44-46]

Além da v-ATPase, a proteína transportadora de aminoácidos ligada ao H^+ (SLC36A1, também conhecida como PAT1) encontra-se ancorada ao lisossomo, sendo conhecida como *nutrisoma*; ambas apresentam funções sensoriais para detecção das concentrações de aminoácidos intralisossômicos capazes de ativar o mTORC1.[24,29,47] A SLC36A1 está localizada tanto na membrana plasmática quanto no endossomo[48,49] e é responsável pelo efluxo dependente de H^+ de aminoácidos do lúmen lisossômico para o citosol. O SLC36A1 parece ser necessário para a ativação do mTOR quando estimulado por aminoácidos,[50] mas também exerce efeito negativo sob a sinalização lisossômica do mTORC1 quando superexpresso.[29] O efluxo/influxo e/ou acúmulo de aminoácidos no lúmen lisossômico é detectado, de alguma forma, pelos *nutrisomas*,[29] causando a ativação do GEF (fator trocador de guanina), funcionando como um verdadeiro complexo *ragulator*, o qual, por sua vez, promove a mudança para GTP do RagA/B, que é necessária para o acoplamento do mTORC1.

Ao longo dos anos, outras proteínas têm apresentado papel de destaque como sensores de aminoácidos por mTORC1, incluindo a proteína quinase ativada por mitógeno (MAP4k3),[51] a proteína humana vacuolar de ordenação 34 (hVPS34)[52] e a monoquinase polifosfato inositol (IPMK).[53] No entanto, desconhece-se como essas moléculas se conectam ao sistema Rag-*ragulator*. A MAP4k3 encontra-se *upstream* das Rag GTPases, mas sua interação ainda não é clara.[54]

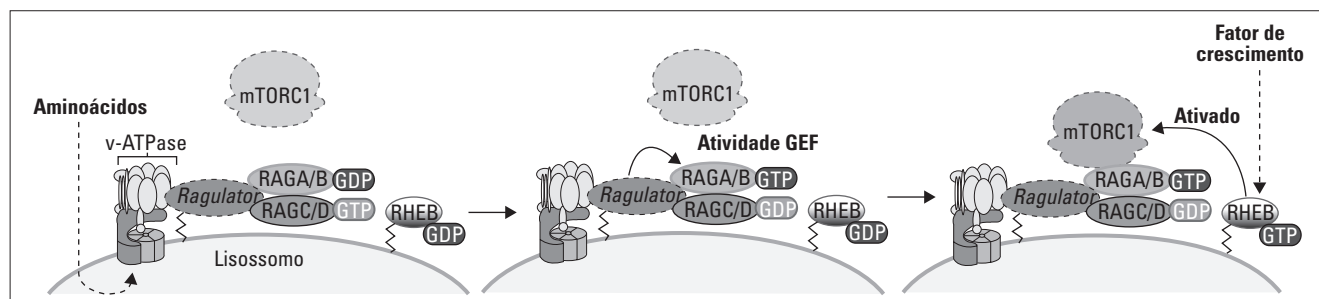



Figura 8.4 Ativação do mTORC1 no lisossomo.

Regulação *downstream* do mTORC1

A síntese proteica é o principal processo controlado pelo mTORC1. Ele fosforila diretamente a quinase 1 S6 (S6K1) e a proteína ligadora 1 do fator de iniciação eucariótico 4E (4E-BP1); S6K1 e 4E-BP1, por sua vez, regulam a iniciação da tradução de RNAm, controlando assim a taxa de síntese proteica (Figura 8.5).[55] A 4E-BP1 suprime a tradução do RNAm quando não fosforilado; no entanto, quando fosforilada pelo mTORC1, essa proteína dissocia-se do fator de iniciação eucariótico 4E (eIF4E), permitindo que este participe da formação do complexo eIF4F, que é necessário para a iniciar a tradução dependente de *cap* na subunidade 5' do RNAm. A ativação da S6K1 favorece a biogênese de RNAm, bem como a iniciação e a elongação da tradução (Figura 8.5). A S6K1 é responsável por controlar a tradução de uma subclasse de RNAm caracterizada por oligopirimidina 5' terminal (5' TOP) e que codifica a maioria dos componentes proteicos da maquinaria de tradução. Apesar do próprio mTORC1 ser fundamental para o controle da tradução de RNAm 5' TOP, a S6K1 e sua proteína ribossômica de substrato S6 não são necessárias para esse processo;[56] no entanto, permanece desconhecido como o mTORC1 controla a tradução desse RNAm.

Figura 8.5 Papel do mTORC1 na síntese de proteínas.

EFEITOS DA LEUCINA SOBRE A SAÚDE METABÓLICA

Os resultados de diversos estudos têm sugerido aumento crescente nos valores de ingestão de ACR (principalmente de leucina), o que pode estar relacionado a efeitos positivos sobre parâmetros associados a obesidade e diabete melito tipo 2 (DM2), como composição corporal, glicemia e saciedade. Efeitos diretos e indiretos dessas respostas positivas vêm sendo propostos.[7,57-67] Por exemplo, a leucina parece ter efeitos diretos sobre os processos hipotalâmicos e no tronco cerebral envolvidos na saciedade.[3,68-76]

No trato gastrintestinal e nos depósitos de gordura, a leucina regula a liberação de hormônios (leptina, grelina e peptídeo semelhante ao glucagon 1) que podem potencialmente afetar a ingestão de alimentos e as concentrações de glicose.[4,62,64,76-78] A insulina e a leucina são sinais anabólicos que alteram o crescimento de tecidos que participam do *turnover* energético, efeito dependente da maior atividade do mTORC1,[5,23,79] e tem sido postulado que a síntese proteica muscular seja a base da maior termogênese induzida pela alimentação, que se encontra associada ao consumo de proteína e ou leucina.[80,81] Além disso, sabe-se que a ingestão de ACR resulta em benefícios à saúde, principalmente em indivíduos com problemas hepáticos.[82-84] No entanto, a ideia de que esses aminoácidos, ou sua suplementação, podem ter papel positivo na redução do risco de doenças metabólicas é controversa. Alguns estudos indicam que as altas concentrações de ACR estão associadas à má saúde metabólica. Tendo em vista os estudos citados, sugerindo benefícios à saúde a partir do aumento da ingestão de ACR, esse comportamento pode parecer paradoxal, haja vista que as concentrações de ACR tendem a ser maiores, e não reduzidas, na obesidade, na resistência à insulina e no DM2.[85-87] Tais aumentos são consistentemente observados em pacientes com DM2 ou com obesidade e em alguns modelos de obesidade ou DM2 em roedores.[85,87-91]

O cérebro e sua regulação do equilíbrio energético: efeitos da leucina sobre o mTOR

O hipotálamo é uma região importante do cérebro, que integra sinais de nutrientes (glicose, aminoácidos e lipídios) e hormônios (como leptina e insulina) e que controla o equilíbrio energético. Em particular, o núcleo arqueado (ARC) do hipotálamo é a principal região

responsável por esse controle. O mTORC1 encontra-se ativado no ARC durante a administração intracerebroventricular de leucina ou de leptina em ratos.[3] Alguns estudos indicam que mTORC1 reduz a ingestão de alimentos, pelo menos, por meio da redução da expressão do neuropeptídeo orexígeno Y (NPY) e do peptídeo relacionado ao agouti (AgRP), no hipotálamo, por meio de um mecanismo que envolve S6K1.[92,93] Em conjunto, esses resultados destacam a importância do eixo de sinalização mTORC1 no hipotálamo, com a regulação central do equilíbrio energético modulada por leucina e hormônios. Por outro lado, outros estudos indicam que a suplementação com leucina piora a adiposidade de ratos previamente expostos a rações hiperlipídicas, possivelmente por afetar circuitos hipotalâmicos envolvidos na regulação do equilíbrio energético, pela maior expressão de hormônio concentrador de melanina (MCH) e de NPY. Do ponto de vista terapêutico, a extrapolação desses resultados indica que indivíduos obesos podem não se beneficiar dos efeitos da suplementação de leucina, embora mais estudos em humanos ainda sejam necessários para testar essa hipótese.[64] Contrariamente aos experimentos de Cota et al.,[3] que administraram leucina intracerebroventricular, Zampieri et al.[71] diluíram leucina na água de beber em seus experimentos. Os autores concluíram que a leucina pode ser detectada pelo cérebro, por ativar a proteína p70S6K. Sugeriram também que a área postrema no hipotálamo é uma suposta área envolvida na quimiorrecepção de leucina no cérebro. Apesar do fato de o cérebro ser capaz de detectar a presença de leucina, a suplementação crônica desse aminoácido (na água de beber) não produz alterações na ingestão de alimentos nem provoca um padrão de expressão do gene anorexígeno no hipotálamo. Embora estudos futuros devam avaliar diretamente as consequências da suplementação de leucina em humanos, esses resultados questionam a possível eficácia da suplementação de leucina como um inibidor de apetite no tratamento da obesidade.

Efeitos do mTORC1 no tecido adiposo

A sinalização do mTORC1 apresenta papel fundamental na adipogênese.[94] *In vitro*, a inibição do mTORC1 bloqueia a adipogênese e dificulta a manutenção dos adipócitos,[95-97] ao passo que a maior ativação do mTORC1 promove a adipogênese.[98] Além de o mTORC1 apresentar importância relevante nesse processo, existe grande possibilidade de os substratos do mTORC1 estarem envolvidos no controle da adipogênese. A S6K1 regula o início do processo adipogênico por meio da regulação da expressão de fatores de transcrição que modulam a formação de novos adipócitos.[99] A 4E-BP1 é responsável por controlar a diferenciação de adipócitos por meio do controle da tradução do PPAR-gama (Figura 8.6).[99,100]

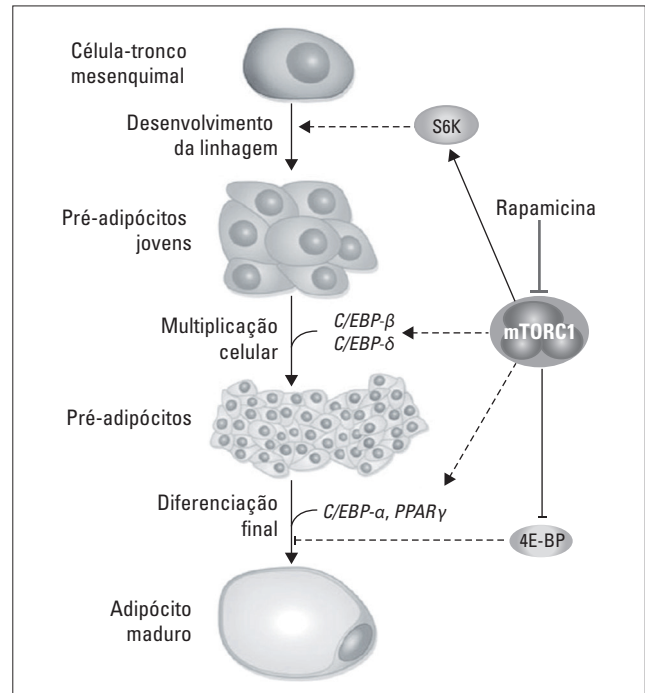



Figura 8.6 Sinalização do mTORC1 na adipogênese. **Fonte:** adaptada de Ricoult e Manning.[101]

Animais com deleção específica de mTORC1 no tecido adiposo apresentam um fenótipo magro, resistente à obesidade induzida por ração hiperlipídica,[95] apresentando menos e menores adipócitos. Por outro lado, a deleção específica de mTORC2 no tecido adiposo gera um animal com massa adiposa normal,[102] mas com defeito na fosforilação da AKT no tecido adiposo, o que se traduz no aumento da lipólise e de ácidos graxos livres.

A expansão do tecido adiposo que caracteriza o estado obeso representa o principal fator de risco para o desenvolvimento de resistência à insulina e do DM2. O mTORC1 é altamente ativo nos tecidos de roedores obesos alimentados com ração hiperlipídica.[103-105] As altas concentrações circulantes de insulina, de citocinas pró-inflamatórias, de leucina (ou ACR) e de glicose desencadeiam maior atividade do mTORC1 em animais obesos. Além de contribuir diretamente para a expansão do tecido adiposo, por meio da ativação dos fatores adipogênicos e lipogênicos, o mTORC1 promove a resistência à insulina no tecido adiposo, por meio da inibição da sinalização da insulina pela fosforilação em serina 307 do IRS1 pela S6K1.[105]

Efeitos do mTORC1 no fígado

O fígado desempenha papel central no controle da homeostase glicêmica e de lipídios em resposta aos estados alimentado e de jejum. O mTORC1 controla a produção hepática de corpos cetônicos que os tecidos periféricos utilizam como fontes de energia durante o jejum.[106] Durante a ausência de alimentos, a atividade de mTORC1 é baixa; porém, animais com mTORC1 hepático cronicamente ativado não são capazes de induzir a cetogênese quando em jejum. O mTORC1 prejudica a atividade de PPAR-alfa, o principal regulador da transcrição de genes cetogênicos, por meio do acúmulo nuclear do correpressor núcleo receptor-1 (NcoR1). Além de seu papel no controle da resposta hepática ao jejum, o mTORC1 também promove o anabolismo no estado alimentado, controlando a lipogênese hepática por meio da regulação da expressão da proteína 1c ligada ao elemento regulatório de esterol (SREBP1c).[107,108]

Como já observado, no músculo e no tecido adiposo, a atividade de mTORC1/S6K1 encontra-se elevada no fígado em modelos experimentais de obesidade, o que promove a degradação do IRS1 e a resistência à insulina hepática.[103,104] O comprometimento da via de sinalização PI3K-AKT no fígado promove a gliconeogênese, contribuindo para a hiperglicemia e a hiperinsulinemia observadas na resistência à insulina e no DM2. A obesidade é o principal fator de risco para o desenvolvimento da esteatose hepática não alcoólica, uma condição caracterizada pelo acúmulo de gordura no fígado e que pode conduzir a complicações graves, incluindo cirrose e carcinoma hepatocelular. O acúmulo de triacilglicerol no fígado de seres humanos obesos está associado com o aumento da lipogênese em hepatócitos.[109] Embora altamente dependente da insulina para sua ativação, a lipogênese é, paradoxalmente, muito ativa no fígado de roedores resistentes à insulina. A ativação sustentada do mTORC1 em resposta a concentrações circulantes de nutrientes (ACR, em especial leucina) e de citocinas pró-inflamatórias pode exacerbar a lipogênese por meio da ativação de SREBP1. Consistente com essa ideia, a deleção específica do mTORC1 no fígado prejudica significativamente a função da SREBP1, levando ao quadro de resistência à esteatose hepática e hipercolesterolemia induzida por ração hiperlipídica.[110] Desse modo, pode-se compreender como a maior atividade de mTORC1 no tecido hepático pode explicar por que a lipogênese permanece ativa mesmo no quadro de resistência à insulina.[111]

Efeitos do mTORC1 no pâncreas

As células beta pancreáticas secretam insulina em resposta a nutrientes e são essenciais na regulação da homeostase da glicose. O controle do crescimento intercedido pela sinalização do mTORC1 em resposta a nutrientes gerou grande interesse no entendimento dessa via de sinalização, na regulação da massa e na função das células beta. A ativação crônica de mTORC1 nas células beta provoca diminuição da glicose circulante e da hiperinsulinemia, além de melhorar a tolerância à glicose.[112,113] Esse fenótipo está associado com aumento no tamanho e no número das células beta, podendo ser revertido pela exposição à rapamicina, indicando que mTORC1 é um regulador essencial da função e da massa de células beta. Além disso, a S6K1 parece mediar alguns dos efeitos do mTORC1, como aqueles identificados em camundongos *knockout* para S6K1, cujo fenótipo é constituído de pequenas células beta, intolerância à glicose, hipoinsulinemia, apresentando secreção de insulina comprometida.[114] Já o *knockout* de mTORC2 em células beta está ligado à redução da atividade de AKT e à ativação do fator de transcrição FoxO1 (fator de transcrição da família *forkhead* BOX O), causando hiperglicemia e intolerância à glicose moderadas, em razão da redução da massa de células beta e da produção e secreção de insulina.[115]

A resistência periférica à insulina e o excesso de nutrientes aumentam a pressão sobre as células beta pancreáticas para a produção de mais insulina. A alta demanda por insulina induz a proliferação e a hipertrofia das células beta e aumenta a formação de progenitores para novas células, o que culmina no aumento da produção e da secreção desse hormônio. Esse processo é conhecido como compensação das células beta. A pressão crônica sobre células beta pode levar à sua morte e ao desenvolvimento do DM2. A atividade de mTORC1 encontra-se elevada nas células beta de animais que consomem ração hiperlipídica ou naqueles geneticamente obesos.[113] O mTORC1 apresenta duplo efeito na regulação da função e da massa das células beta em resposta à sobrecarga de nutrientes e à resistência à insulina. Embora o mTORC1 regule positivamente a massa das células beta e a secreção de insulina, a crônica ativação de mTORC1/S6K1 piora a resistência à insulina, por meio da inibição por *feedback* da IRS1 e IRS2, o que reduz a sobrevivência dessas células e promove a apoptose.[113,116] Respaldando essa hipótese, a ativação crônica de mTORC1 nas células beta aumentaria sua massa na primeira fase da vida, mas, durante o envelhecimento, essa mesma ativação tornaria o indivíduo hiperglicêmico e hipoinsulinêmico, em razão da perda das células beta.[113]

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos envolvendo biologia molecular evidenciam a ampla capacidade de regulação da expressão gênica por

aminoácidos, a qual inclui uma grande variedade de mecanismos, como ativação de diferentes vias de sinalização e de fatores de transcrição. Nesse contexto, destaca-se o aminoácido leucina, o qual atua em vias relacionadas com a resposta inflamatória, proliferação, diferenciação e sobrevivência celular e em diferentes vias metabólicas. O maior conhecimento relacionado à regulação da expressão gênica pela leucina propiciará que futuros estudos envolvendo nutrição clínica e esportiva e a suplementação desse aminoácido se traduzam em novas formas de tratamento ou de intervenção nutricional nessas áreas.

REFERÊNCIAS

1. Su Y et al. Hypothalamic leucine metabolism regulates liver glucose production. Diabetes. 2012;61(1):85-93. ISSN 0012-1797.
2. Zhou Y et al. Transamination is required for {alpha}-ketoisocaproate but not leucine to stimulate insulin secretion. J Biol Chem. 2010;285(44):33718-26. ISSN 0021-9258.
3. Cota D et al. Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. Science. 2006;312(5775): 927-30. ISSN 0036-8075.
4. Lynch CJ et al. Leucine in food mediates some of the postprandial rise in plasma leptin concentrations. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2006;291(3):E621-30. ISSN 0193-1849.
5. Lynch CJ et al. Leucine is a direct-acting nutrient signal that regulates protein synthesis in adipose tissue. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2002;283(3):E503-13. ISSN 0193-1849.
6. Nishitani S et al. Leucine promotes glucose uptake in skeletal muscles of rats. Biochem Biophys Res Commun. 2002;299(5):693-96. ISSN 0006-291X.
7. Layman DK, Walker DA. Potential importance of leucine in treatment of obesity and the metabolic syndrome. J Nutr. 2006;136(1 Suppl):319s-23s. ISSN 0022-3166.
8. Drummond MJ et al. Nutritional and contractile regulation of human skeletal muscle protein synthesis and mTORC1 signaling. J Appl Physiol. 2009;106(4):1374-84. ISSN 8750-7587.
9. Nagasawa T et al. Rapid suppression of protein degradation in skeletal muscle after oral feeding of leucine in rats. J Nutr Biochem. 2002;13(2):121-27. ISSN 0955-2863.
10. Kimball SR et al. Rapid turnover of the mTOR complex 1 (mTORC1) repressor REDD1 and activation of mTORC1 signaling following inhibition of protein synthesis. J Biol Chem. 2008;283(6):3465-75. ISSN 0021-9258.
11. Kim E et al. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. Nat Cell Biol. 2008;10(8):935-45. ISSN 1465-7392.
12. Proud CG. mTOR-mediated regulation of translation factors by amino acids. Biochem Biophys Res Commun. 2004;313(2):429-36. ISSN 0006-291X.
13. Souba WW, Pacitti AJ. How amino acids get into cells: mechanisms, models, menus, and mediators. JPEN J Parenter Enteral Nutr. 1992 Nov-Dec;16(6):569-78.
14. Drummond MJ et al. An increase in essential amino acid availability upregulates amino acid transporter expression in human skeletal muscle. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2010;298(5):E1011-8. ISSN 0193-1849.
15. Liu XM et al. Platelet-derived growth factor stimulates LAT1 gene expression in vascular smooth muscle: role in cell growth. Faseb J. 2004;18(6):768-70. ISSN 0892-6638.
16. Evans K, Nasim Z, Brown J, Butler H, Kauser S, Varoqui H, et al. Acidosis-sensing glutamine pump SNAT2 determines amino acid levels and mammalian target of rapamycin signalling to protein synthesis in L6 muscle cells. J Am Soc Nephrol. 2007 May;18(5):1426-36.
17. Hyde R et al. Ceramide down-regulates System A amino acid transport and protein synthesis in rat skeletal muscle cells. Faseb J. 2005;19(3):461-63. ISSN 0892-6638.
18. Bevington A et al. Impaired system A amino acid transport mimics the catabolic effects of acid in L6 cells. Eur J Clin Invest. 2002;32(8):590-602. ISSN 0014-2972.
19. Mittendorfer B, Volpi E, Wolfe RR. Whole body and skeletal muscle glutamine metabolism in healthy subjects. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2001;280(2):E323-33. ISSN 0193-1849.
20. Baird FE et al. Tertiary active transport of amino acids reconstituted by coexpression of System A and L transporters in Xenopus oocytes. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009;297(3):E822-9. ISSN 0193-1849.
21. Evans K, Nasim Z, Brown J, Clapp E, Amin A, Yang B, Herbert TP, Bevington A. Inhibition of SNAT2 by metabolic acidosis enhances proteolysis in skeletal muscle. J Am Soc Nephrol. 2008 Nov;19(11):2119-29.
22. Nicklin P et al. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. Cell. 2009;136(3):521-34. ISSN 0092-8674.
23. Dodd KM, Tee AR. Leucine and mTORC1: a complex relationship. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2012;302(11):E1329-42. ISSN 0193-1849.
24. Kim SG et al. Nutrient regulation of the mTOR complex 1 signaling pathway. Mol Cells. 2013;35(6):463-73. ISSN 1016-8478.
25. Han JM et al. Leucyl-tRNA synthetase is an intracellular leucine sensor for the mTORC1-signaling pathway. Cell. 2012;149(2):410-24. ISSN 0092-8674.
26. Chiu M et al. Glutamine stimulates mTORC1 independent of the cell content of essential amino acids. Amino Acids. 2012;43(6):2561-67. ISSN 0939-4451.
27. Durán RV, Oppliger W, Robitaille AM, Heiserich L, Skendaj R, Gottlieb E, Hall MN. Glutaminolysis activates Rag-mTORC1 signaling. Mol Cell. 2012 Aug 10;47(3):349-58.
28. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. Cell. 2012;149(2):274-93. ISSN 0092-8674.
29. Zoncu R et al. mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase. Science. 2011;334(6056):678-83. ISSN 0036-8075.
30. Inoki K et al. TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. Cell. 2006;126(5):955-68. ISSN 0092-8674.
31. Gwinn DM et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. Mol Cell. 2008;30(2):214-26. ISSN 1097-2765.
32. Sancak Y et al. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. Science. 2008;320(5882):1496-501. ISSN 0036-8075.
33. Hara K et al. Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. J Biol Chem. 1998;273(23):14484-94. ISSN 0021-9258.
34. Wang X et al. Amino acid availability regulates p70 S6 kinase and multiple translation factors. Biochem J. 1998;334(Pt 1):261-67. ISSN 0264-6021.
35. Bauchart-Thevret C et al. Arginine-induced stimulation of protein synthesis and survival in IPEC-J2 cells is mediated by

mTOR but not nitric oxide. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2010;299(6):E899-909. ISSN 0193-1849.
36. van der Vos KE, Coffer PJ. Glutamine metabolism links growth factor signaling to the regulation of autophagy. Autophagy. 2012 Dec;8(12):1862-4.
37. van der Vos KE, Eliasson P, Proikas-Cezanne T, Vervoort SJ, van Boxtel R, Putker M, et al. Modulation of glutamine metabolism by the PI(3)K-PKB-FOXO network regulates autophagy. Nat Cell Biol. 2012 Aug;14(8):829-37.
38. Long X et al. Rheb binding to mammalian target of rapamycin (mTOR) is regulated by amino acid sufficiency. J Biol Chem. 2005;280(25):23433-36. ISSN 0021-9258.
39. Smith EM et al. The tuberous sclerosis protein TSC2 is not required for the regulation of the mammalian target of rapamycin by amino acids and certain cellular stresses. J Biol Chem. 2005;280(19):18717-27. ISSN 0021-9258.
40. Sancak Y et al. Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. Cell. 2010;141(2):290-303. ISSN 0092-8674.
41. De Virgilio C, Loewith R. Cell growth control: little eukaryotes make big contributions. Oncogene. 2006;25(48):6392-415. ISSN 0950-9232.
42. Li L et al. Regulation of mTORC1 by the Rab and Arf GTPases. J Biol Chem. 2010;285(26):19705-09. ISSN 0021-9258.
43. Binda M et al. The Vam6 GEF controls TORC1 by activating the EGO complex. Mol Cell. 2009;35(5):563-73. ISSN 1097-2765.
44. Bar-Peled L et al. Ragulator is a GEF for the rag GTPases that signal amino acid levels to mTORC1. Cell. 2012:150(6):1196-208. ISSN 0092-8674.
45. Pena-Llopis S et al. Regulation of TFEB and V-ATPases by mTORC1. Embo J. 2011;30(16):3242-58. ISSN 0261-4189.
46. Duvel K et al. Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. Mol Cell. 2010;39(2):171-83. ISSN 1097-2765.
47. Ogmundsdottir MH et al. Proton-assisted amino acid transporter PAT1 complexes with Rag GTPases and activates TORC1 on late endosomal and lysosomal membranes. PLoS One. 2012;7(5):e36616. ISSN 1932-6203.
48. Schioth HB et al. Evolutionary origin of amino acid transporter families SLC32, SLC36 and SLC38 and physiological, pathological and therapeutic aspects. Mol Aspects Med. 2013;34(2-3):571-85. ISSN 0098-2997.
49. Sagné C, Agulhon C, Ravassard P, Darmon M, Hamon M, El Mestikawy S, et al. Identification and characterization of a lysosomal transporter for small neutral amino acids. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Jun 19;98(13):7206-11.
50. Heublein S et al. Proton-assisted amino-acid transporters are conserved regulators of proliferation and amino-acid-dependent mTORC1 activation. Oncogene. 2010:29(28):4068-79. ISSN 0950-9232.
51. Findlay GM et al. A MAP4 kinase related to Ste20 is a nutrient-sensitive regulator of mTOR signalling. Biochem J. 2007;403(1):13-20. ISSN 0264-6021.
52. Nobukuni T et al. Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. Proc Natl Acad Sci USA. 2005;102(40):14238-43. ISSN 0027-8424.
53. Kim J et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. Nat Cell Biol. 2011;13(2):132-41. ISSN 1465-7392.
54. Yan L et al. PP2A T61 epsilon is an inhibitor of MAP4K3 in nutrient signaling to mTOR. Mol Cell. 2010;37(5):633-42. ISSN 1097-2765.
55. Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. Nat Rev Mol Cell Biol. 2009;10(5):307-18. ISSN 1471-0072.
56. Tang H et al. Amino acid-induced translation of TOP mRNAs is fully dependent on phosphatidylinositol 3-kinase-mediated signaling, is partially inhibited by rapamycin, and is independent of S6K1 and rpS6 phosphorylation. Mol Cell Biol. 2001;21(24):8671-83. ISSN 0270-7306.
57. Binder E et al. Leucine supplementation modulates fuel substrates utilization and glucose metabolism in previously obese mice. Obesity (Silver Spring). 2014;22(3):713-20. ISSN 1930-7381.
58. Chen H et al. Leucine improves glucose and lipid status in offspring from obese dams, dependent on diet type, but not caloric intake. J Neuroendocrinol. 2012;24(10):1356-64. ISSN 0953-8194.
59. Li H et al. Leucine supplementation increases SIRT1 expression and prevents mitochondrial dysfunction and metabolic disorders in high-fat diet-induced obese mice. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2012;303(10):E1234-44. ISSN 0193-1849.
60. Macotela Y et al. Dietary leucine--an environmental modifier of insulin resistance acting on multiple levels of metabolism. PLoS One. 2011;6(6):e21187. ISSN 1932-6203.
61. Qin LQ et al. Higher branched-chain amino acid intake is associated with a lower prevalence of being overweight or obese in middle-aged East Asian and Western adults. J Nutr. 2011;141(2):249-54. ISSN 0022-3166.
62. Torres-Leal FL et al. Leucine supplementation improves adiponectin and total cholesterol concentrations despite the lack of changes in adiposity or glucose homeostasis in rats previously exposed to a high-fat diet. Nutr Metab (Lond). 2011;8(1):62. ISSN 1743-7075.
63. Guo K et al. Chronic leucine supplementation improves glycemic control in etiologically distinct mouse models of obesity and diabetes mellitus. Nutr Metab (Lond). 2010;7:57. ISSN 1743-7075.
64. Chen Q, Reimer RA. Dairy protein and leucine alter GLP-1 release and mRNA of genes involved in intestinal lipid metabolism in vitro. Nutrition. 2009;25(3):340-49. ISSN 0899-9007.
65. Nairizi A et al. Leucine supplementation of drinking water does not alter susceptibility to diet-induced obesity in mice. J Nutr. 2009;139(4):715-19. ISSN 0022-3166.
66. Zhang Y et al. Increasing dietary leucine intake reduces diet-induced obesity and improves glucose and cholesterol metabolism in mice via multimechanisms. Diabetes. 2007;56(6):1647-54. ISSN 0012-1797.
67. Norton LE, Layman DK. Leucine regulates translation initiation of protein synthesis in skeletal muscle after exercise. J Nutr. 2006;136(2):533s-537s. ISSN 0022-3166.
68. Laeger T et al. Leucine acts in the brain to suppress food intake but does not function as a physiological signal of low dietary protein. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2014;307(3):R310-20. ISSN 0363-6119.
69. Zampieri TT et al. L-leucine supplementation worsens the adiposity of already obese rats by promoting a hypothalamic pattern of gene expression that favors fat accumulation. Nutrients. 2014;6(4):1364-73. ISSN 2072-6643.
70. Schwartz GJ. Central leucine sensing in the control of energy homeostasis. Endocrinol Metab Clin North Am. 2013;42(1):81-87. ISSN 0889-8529.

71. Zampieri TT et al. Oral leucine supplementation is sensed by the brain but neither reduces food intake nor induces an anorectic pattern of gene expression in the hypothalamus. PLoS One. 2013;8(12):e84094. ISSN 1932-6203.
72. Blouet C, Schwartz GJ. Brainstem nutrient sensing in the nucleus of the solitary tract inhibits feeding. Cell Metab. 2012;16(5):579-87. ISSN 1550-4131.
73. Stevanovic D et al. Intracerebroventricular administration of metformin inhibits ghrelin-induced Hypothalamic AMP-kinase signalling and food intake. Neuroendocrinology. 2012;96(1):24-31. ISSN 0028-3835.
74. Lopez N et al. Dietary l-leucine supplementation of lactating rats results in a tendency to increase lean/fat ratio associated to lower orexigenic neuropeptide expression in hypothalamus. Peptides. 2010;31(7):1361-67. ISSN 0196-9781.
75. Blouet C et al. Mediobasal hypothalamic leucine sensing regulates food intake through activation of a hypothalamus-brainstem circuit. J Neurosci. 2009;29(26):8302-11. ISSN 0270-6474.
76. Potier M, Darcel N, Tome D. Protein, amino acids and the control of food intake. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2009;12(1):54-58. ISSN 1363-1950.
77. Salehi A et al. The insulinogenic effect of whey protein is partially mediated by a direct effect of amino acids and GIP on beta-cells. Nutr Metab (Lond). 2012;9(1):48. ISSN 1743-7075.
78. Xu G et al. Gastric mammalian target of rapamycin signaling regulates ghrelin production and food intake. Endocrinology. 2009;150(8):3637-44. ISSN 0013-7227.
79. Vary TC, Lynch CJ. Nutrient signaling components controlling protein synthesis in striated muscle. J Nutr. 2007;137(8):1835-43. ISSN 0022-3166.
80. Yamaoka I. Modification of core body temperature by amino acid administration. Asia Pac J Clin Nutr. 2008;17(Suppl 1):309-11. ISSN 0964-7058.
81. Layman DK, Baum JI. Dietary protein impact on glycemic control during weight loss. J Nutr. 2004;134(4):968s-73s. ISSN 0022-3166.
82. Kawaguchi T, Taniguchi E, Sata M. Effects of oral branched-chain amino acids on hepatic encephalopathy and outcome in patients with liver cirrhosis. Nutr Clin Pract. 2013;28(5):580-88. ISSN 0884-5336.
83. Ichikawa K et al. Branched-chain amino acid-enriched nutrients stimulate antioxidant DNA repair in a rat model of liver injury induced by carbon tetrachloride. Mol Biol Rep. 2012;39(12):10803-10. ISSN 0301-4851.
84. Kuwahata M et al. Supplementation with branched-chain amino acids attenuates hepatic apoptosis in rats with chronic liver disease. Nutr Res. 2012;32(7):522-29. ISSN 0271-5317.
85. Lackey DE et al. Regulation of adipose branched-chain amino acid catabolism enzyme expression and cross-adipose -amino acid flux in human obesity. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2013;304(11):E1175-87. ISSN 0193-1849.
86. Newgard CB. Interplay between lipids and branched-chain amino acids in development of insulin resistance. Cell Metab. 2012;15(5):606-14. ISSN 1550-4131.
87. Newgard CB et al. A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. Cell Metab. 2009;9(4):311-26. ISSN 1550-4131.
88. Olson KC et al. Alloisoleucine differentiates the branched-chain aminoacidemia of Zucker and dietary obese rats. Obesity (Silver Spring). 2014;22(5):1212-15. ISSN 1930-7381.
89. She P et al. Leucine and protein metabolism in obese Zucker rats. PLoS One. 2013;8(3):e59443. ISSN 1932-6203.
90. Herman MA et al. Adipose tissue branched chain amino acid (BCAA) metabolism modulates circulating BCAA levels. J Biol Chem. 2010;285(15):11348-56. ISSN 0021-9258.
91. She P et al. Obesity-related elevations in plasma leucine are associated with alterations in enzymes involved in branched-chain amino acid metabolism. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2007;293(6):E1552-63. ISSN 0193-1849.
92. Blouet C, Ono H, Schwartz GJ. Mediobasal hypothalamic p70 S6 kinase 1 modulates the control of energy homeostasis. Cell Metab. 2008;8(6):459-67. ISSN 1550-4131.
93. Cota D et al. The role of hypothalamic mammalian target of rapamycin complex 1 signaling in diet-induced obesity. J Neurosci. 2008;28(28):7202-08. ISSN 0270-6474.
94. Laplante M, Sabatini DM. An emerging role of mTOR in lipid biosynthesis. Curr Biol. 2009;19(22):R1046-52. ISSN 0960-9822.
95. Polak P et al. Adipose-specific knockout of raptor results in lean mice with enhanced mitochondrial respiration. Cell Metab. 2008;8(5):399-410. ISSN 1550-4131.
96. Kim JE, Chen J. regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis. Diabetes. 2004;53(11):2748-56. ISSN 0012-1797.
97. Gagnon A, Lau S, Sorisky A. Rapamycin-sensitive phase of 3T3-L1 preadipocyte differentiation after clonal expansion. J Cell Physiol. 2001;189(1):14-22. ISSN 0021-9541.
98. Zhang HH et al. Insulin stimulates adipogenesis through the Akt-TSC2-mTORC1 pathway. PLoS One. 2009;4(7):e6189. ISSN 1932-6203.
99. Carnevalli LS et al. S6K1 plays a critical role in early adipocyte differentiation. Dev Cell. 2010;18(5):763-74. ISSN 1534-5807.
100. Le Bacquer O et al. Elevated sensitivity to diet-induced obesity and insulin resistance in mice lacking 4E-BP1 and 4E-BP2. J Clin Invest. 2007;117(2):387-96. ISSN 0021-9738.
101. Ricoult SJH, Manning BD. Embo Rep. 2013;14:242-251.
102. Kumar A et al. Fat cell-specific ablation of rictor in mice impairs insulin-regulated fat cell and whole-body glucose and lipid metabolism. Diabetes. 2010;59(6):1397-406. ISSN 0012-1797.
103. Tremblay F et al. Identification of IRS-1 Ser-1101 as a target of S6K1 in nutrient- and obesity-induced insulin resistance. Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104(35):14056-61. ISSN 0027-8424.
104. Khamzina L et al. Increased activation of the mammalian target of rapamycin pathway in liver and skeletal muscle of obese rats: possible involvement in obesity-linked insulin resistance. Endocrinology. 2005;146(3):1473-81. ISSN 0013-7227.
105. Um SH et al. Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. Nature. 2004;431(7005):200-5. ISSN 0028-0836.
106. Sengupta S et al. mTORC1 controls fasting-induced ketogenesis and its modulation by ageing. Nature. 2010,468(7327):1100-4. ISSN 0028-0836.
107. Yecies JL et al. Akt stimulates hepatic SREBP1c and lipogenesis through parallel mTORC1-dependent and independent pathways. Cell Metab. 2011;14(1):21-32. ISSN 1550-4131.
108. Li S, Brown MS, Goldstein JL. Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis. Proc Natl Acad Sci USA. 2010;107(8):3441-46. ISSN 0027-8424.

109. Donnelly KL et al. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. J Clin Invest. 2005;115(5):1343-51. ISSN 0021-9738.
110. Peterson TR et al. mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. Cell. 2011;146(3):408-20. ISSN 0092-8674.
111. Brown MS, Goldstein JL. Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. Cell Metab. 2008;7(2):95-96. ISSN 1550-4131.
112. Rachdi L et al. Disruption of Tsc2 in pancreatic beta cells induces beta cell mass expansion and improved glucose tolerance in a TORC1-dependent manner. Proc Natl Acad Sci USA. 2008;105(27):9250-55. ISSN 0027-8424.
113. Shigeyama Y et al. Biphasic response of pancreatic beta-cell mass to ablation of tuberous sclerosis complex 2 in mice. Mol Cell Biol. 2008;28(9):2971-79. ISSN 0270-7306.
114. Pende M et al. Hypoinsulinaemia, glucose intolerance and diminished beta-cell size in S6K1-deficient mice. Nature. 2000;408(6815):994-97. ISSN 0028-0836.
115. Gu Y et al. Rictor/mTORC2 is essential for maintaining a balance between beta-cell proliferation and cell size. Diabetes. 2011;60(3):827-37. ISSN 0012-1797.
116. Elghazi L et al. Decreased IRS signaling impairs beta-cell cycle progression and survival in transgenic mice overexpressing S6K in beta-cells. Diabetes. 2010;59(10):2390-99. ISSN 0012-1797.

9 Ácidos graxos de cadeia curta

Marco Aurélio Ramirez Vinolo
Rui Curi

INTRODUÇÃO

Nomenclatura e estrutura química

Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), quimicamente, são ácidos carboxílicos que apresentam uma pequena cadeia alifática. Essas moléculas possuem de um a quatro átomos de carbono em sua estrutura, conforme mostrado na Figura 9.1.[1]

Nomenclatura comum	Cadeia alifática (R)
Ácido fórmico	– H
Ácido acético	– CH_3
Ácido propiônico	– CH_2CH_3
Ácido butírico	– $CH_2CH_2CH_3$
Ácido isobutírico	– $CH(CH_3)_2$

Figura 9.1 Estrutura e nomenclatura dos ácidos graxos de cadeia curta.

Historicamente, esses compostos receberam a denominação de ácidos graxos; porém, uma vez que não são lipofílicos (característica essencial destes últimos), em razão do pequeno tamanho de sua cadeia lateral, deveriam ser designados ácidos carboxílicos. Além disso, alguns autores utilizam a denominação ácidos voláteis para se referir a eles, o que se deve, em parte, ao fato de serem voláteis em temperatura ambiente. Neste capítulo será utilizada a denominação AGCC em referência a esses compostos, por ser a mais utilizada na literatura. Serão descritos os efeitos de três desses compostos, os ácidos acético, propiônico e butírico, uma vez que são os mais abundantes nos mamíferos e os mais estudados até o momento. Vale ressaltar que, como em pH fisiológico esses compostos são encontrados na forma de sais, ao longo do texto será utilizada a terminologia *acetato*, *propionato* e *butirato* em vez de ácidos.[1]

Produção dos ácidos graxos de cadeia curta

Os AGCC são gerados durante o metabolismo de lipídios e carboidratos (produção endógena) e no trato gastrintestinal, principalmente no cólon, durante a fermentação bacteriana de carboidratos e proteínas (produção exógena). Embora esta última seja a principal fonte de AGCC ao organismo em certas condições, incluindo jejum prolongado, intolerância à glicose e diabete melito, nas quais há um aumento considerável da oxidação de ácidos graxos, e após ingestão de álcool (aumento de 10 vezes na concentração de acetato no sangue), a via endógena contribui de maneira importante para as concentrações plasmáticas desses compostos.[2-4]

Os AGCC são gerados em grandes quantidades no trato gastrintestinal, principalmente no cólon, pela ação de bactérias da microbiota intestinal. Estas últimas utilizam carboidratos não digeríveis pelas enzimas intrínsecas do organismo, incluindo polissacarídeos e oligossacarídeos como fontes de energia pelo processo de fermentação. Além disso, carboidratos simples e aminoácidos que não tiverem sido absorvidos nas porções anteriores do intestino também são utilizados pelas bactérias intestinais.[5]

Diferentes bactérias do trato gastrintestinal contribuem para a geração intestinal de AGCC. As diversas espécies de bactérias que compõem a microbiota intestinal podem gerar AGCC por vias diferentes e produzir predominantemente um ou outro tipo de AGCC. Em geral, a principal via de produção de AGCC é a glicolítica, embora outras vias, incluindo a das pentoses e a redutora de acetil-CoA (também conhecida como via de Wood-Ljungdahl), também sejam relevantes no caso de algumas espécies de bactérias.[3,4]

A concentração de AGCC difere de acordo com a porção do intestino. No cólon proximal, suas concentrações variam de 70 a 140 mM e diminuem para 20 a 70 mM no cólon distal.[6,7] A razão de produção de acetato, propionato e butirato é de, aproximadamente, 60:20:20. Porém, tanto a razão quanto as concentrações absolutas desses compostos ao longo do trato gastrintestinal variam de acordo com alguns fatores, incluindo alimentação, porção do intestino, tempo de trânsito intestinal e composição da microbiota.[8]

Absorção e metabolização

Após sua liberação, os AGCC produzidos pelas bactérias da microbiota são rapidamente absorvidos pelas células intestinais, parcialmente utilizados como substrato energético e passam para a corrente sanguínea, atuando em outros tecidos. A absorção de AGCC no ceco e no cólon é um processo muito eficiente, o que se reflete no fato de que menos de 5% da quantidade desses metabólicos gerados no intestino é excretada nas fezes.[9,10]

Com relação à absorção dos AGCC, são conhecidos ao menos dois mecanismos envolvidos:

- Difusão simples da forma protonada.
- Absorção da forma ionizada dos AGCC.

Há, no mínimo, duas proteínas de membrana expressas nos colonócitos e ao longo de todo o intestino delgado e ceco, as quais fazem o transporte ativo da forma protonada dos AGCC: o transportador de monocarboxilato (MCT-1) e o transportador de monocarboxilato acoplado ao sódio (SMCT-1).[1] Vale ressaltar que a absorção desses compostos está associada ao processo de absorção hídrica e de sais e que modificações nas suas concentrações estão envolvidas em casos de diarreia.[11] Nesse sentido, alterações na produção de AGCC no trato gastrintestinal – seja após o uso de antibióticos que acarretam destruição de parte da microbiota e consequente redução na produção de AGCC ou após retirada de parte do intestino grosso – têm sido associadas a casos de diarreia, evidenciando a importância desses produtos do metabolismo bacteriano no processo de absorção de sais e fluidos.[12]

Após absorção, os AGCC são metabolizados essencialmente por três tecidos: intestinal (nas células epiteliais do cólon e ceco), hepático e muscular, sendo que o último utiliza, principalmente, acetato como fonte de energia.[13] Os colonócitos metabolizam 70 a 90% do butirato absorvido.[13] Este é o principal substrato energético dessas células, que o metabolizam preferencialmente em detrimento dos outros AGCC, glicose e glutamina.[6] Por sua vez, cerca de 90% do butirato presente no sangue portal é extraído pelo fígado, de modo que suas concentrações plasmáticas são muito baixas, conforme descrito adiante.[3,14] A metabolização do butirato ocorre exclusivamente no interior da mitocôndria (fonte de acetil CoA independente de carnitina), e esse composto também constitui um potencial substrato para a cetogênese.[15] Já o acetato é pouco metabolizado no cólon devido, em parte, ao fato de ser rapidamente absorvido e transportado para o fígado.[13] Após sua absorção, cerca de 75% do acetato é captado e metabolizado no fígado, onde pode ser utilizado por diversas vias: na síntese de ácidos graxos de cadeia longa (lipogênese), corpos cetônicos (cetogênese), colesterol (fonte primária para a síntese de colesterol), glutamina e glutamato. O restante do acetato que alcança a circulação é rapidamente captado e oxidado por vários tecidos, como músculos e glândulas mamárias.[16]

Apenas 10% do propionato absorvido permanece na corrente sanguínea após a passagem pelo fígado. Neste órgão, esse AGCC é metabolizado, inibe a síntese de colesterol e pode ser utilizado como substrato — via formação de piruvato — da gliconeogênese.[17] Ele também pode ser gerado durante o catabolismo de aminoácidos de cadeia ramificada e metionina. Sua concentração plasmática pode estar aumentada em condições nas quais há elevação das taxas de oxidação de aminoácidos.[15]

Considerando o fato de que os AGCC são amplamente metabolizados no próprio trato gastrintestinal e em menor extensão pelo fígado, é pertinente o fato de que suas concentrações no sangue periférico sejam normalmente muito baixas. O acetato, AGCC encontrado em maior concentração no organismo, está presente em concentrações séricas que variam de 60 a 150 μM. Já para o propionato e o butirato, foram descritas concentrações séricas de 3 a 7 μM e de 1 a 4 μM, respectivamente.[3,14,18]

PRINCIPAIS EFEITOS ATRIBUÍDOS AOS AGCC

Além de constituírem fonte energética importante para diferentes células do organismo, os AGCC também modificam a função de diversos tipos celulares e tecidos, conforme ilustrado na Figura 9.2.

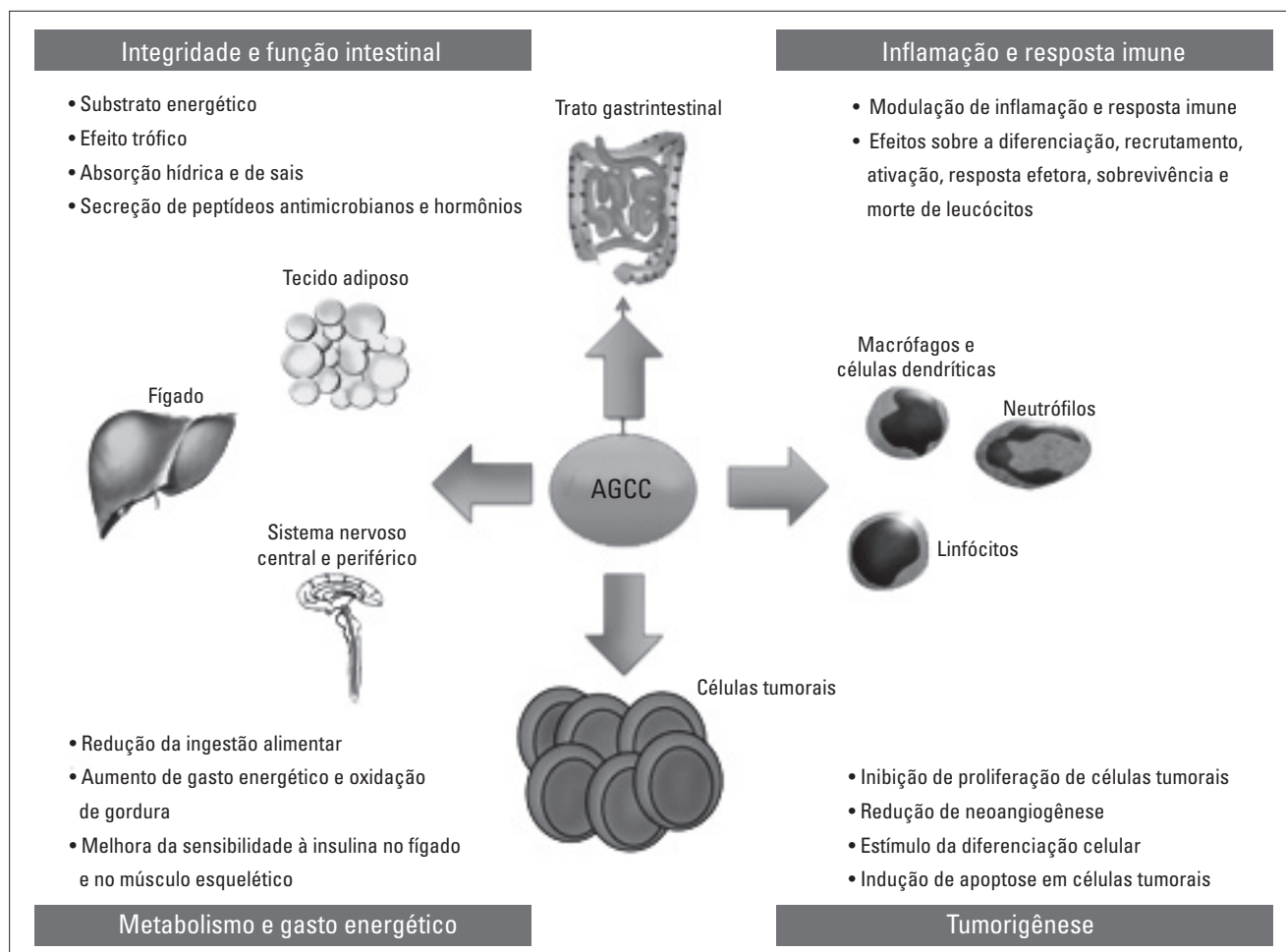



Figura 9.2 Principais ações dos ácidos graxos de cadeia curta. AGCC: ácidos graxos de cadeia curta.

Efeitos no trato gastrintestinal

Os AGCC apresentam efeitos importantes no trato gastrintestinal. Esses compostos são importantes para a manutenção da integridade das células epiteliais que delimitam o intestino. Além de constituírem fonte de energia para essas células, os AGCC também induzem proliferação das células epiteliais normais do cólon e a morte por apoptose de células mutadas (neoplásicas). Esses compostos também regulam a permeabilidade intestinal, favorecendo a função de barreira exercida pelas células que recobrem o intestino e impedem a entrada de compostos prejudiciais ao organismo, como o lipopolissacarídeo (LPS), componente de bactérias Gram-negativas.[19] Ainda no trato gastrintestinal, os AGCC regulam a motilidade intestinal e o fluxo sanguíneo e contribuem para a manutenção do pH (acidificação) e para a absorção hídrica e de sais.[1] Esse primeiro efeito pode ter relevância na proteção do organismo contra infecções bacterianas.

A secreção de hormônios como peptídeo YY (PYY) e peptídeo semelhante ao glucagon (GLP) por células enteroendócrinas presentes no trato gastrintestinal é induzida pelos AGCC.[20,21] Vale ressaltar que esses hormônios têm ações importantes no controle da ingestão alimentar e do gasto energético e podem ser relevantes para os efeitos metabólicos dos AGCC (descritos a seguir).

Efeitos sobre o sistema imune e a inflamação

Os AGCC também apresentam efeitos sistêmicos importantes, incluindo ações sobre os sistemas imune e nervoso, além de tecidos e órgãos metabolicamente relevantes como fígado, tecido adiposo e músculo esquelético.

Sabe-se que os AGCC modulam a diferenciação, a proliferação, o recrutamento, a ativação e a função efetora de células envolvidas na resposta imune.[22] A seguir são ressaltados alguns dos principais efeitos desses compostos.

Os AGCC têm efeitos anti-inflamatórios que decorrem da inibição da produção de mediadores inflamatórios por células como macrófagos, monócitos e neutrófilos. Essas células, uma vez ativadas por moléculas microbianas

(MAMP, padrões moleculares associados a micro-organismos) ou liberadas após dano celular (DAMP, padrões moleculares associados ao dano), produzem grandes quantidades de moléculas, incluindo citocinas como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), as interleucinas (IL) 1 e 6, quimiocinas (p. ex., Cxcl-1 e Cxcl-2), óxido nítrico (NO), entre outras. Esses mediadores atuam em conjunto, recrutando e ativando leucócitos e amplificando a resposta inflamatória.[22]

Os AGCC, principalmente propionato e butirato, reduzem a produção desses mediadores, o que decorre, em parte, conforme discutido adiante, de suas ações sobre a ativação do fator de transcrição NF-kB (fator nuclear kappa B). Além disso, os AGCC também modificam a produção de eicosanoides, que são moléculas lipídicas, como as prostaglandinas e os leucotrienos, derivadas da metabolização do ácido araquidônico por enzimas como a ciclo-oxigenase e a lipoxigenase. Nesse sentido, demonstrou-se que o butirato modula a síntese e a secreção de prostaglandina E2 e outros eicosanoides, incluindo o leucotrieno B4 e o tromboxano B2, efeito que pode ser relevante no controle da inflamação.[23,24] Os mecanismos envolvidos nos efeitos dos AGCC sobre a produção de eicosanoides ainda não foram totalmente esclarecidos. Há indicações na literatura de que os AGCC atuem tanto via receptores acoplados à proteína G (GPCR, *G-protein coupled receptors* – efeito inibido por toxina pertussis)[24] quanto via modulação da expressão de enzimas fundamentais na geração desses mediadores, como a ciclo-oxigenase 2, o que pode decorrer da ação sobre histonas desacetilases,[23] conforme descrito adiante.

Quanto ao recrutamento de leucócitos, sabe-se que os AGCC podem tanto aumentar quanto diminuir a migração dessas células e, particularmente, de neutrófilos para os locais de inflamação. Isso se deve, em parte, ao fato de que os AGCC têm efeito quimioatrativo por interação direta com GPCR presentes na membrana dos leucócitos (como o GPR41 e o GPR43), e também podem controlar o influxo de leucócitos via seus efeitos na produção de mediadores inflamatórios ou na expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais.[22]

Os AGCC inibem a proliferação e modificam o processo de diferenciação de linfócitos T, células envolvidas na resposta imune adaptativa, em resposta a estímulos como a concanavalina A e o anticorpo anti-CD3, bem como reduzem a produção de citocinas, como a IL-2, a qual é essencial à resposta proliferativa de linfócitos. Nesse sentido, recentemente, diferentes grupos de pesquisadores demonstraram que os AGCC têm papel relevante na geração e função de células T regulatórias (Treg) no sistema imune associado ao intestino.[25-27] Vale ressaltar que as células Treg têm papel essencial na manutenção da homeostase do organismo por regularem a resposta imune e inflamatória. Além disso, em outro trabalho, os autores sugerem que os AGCC, via suas ações em células dendríticas e macrófagos, reduzem a diferenciação de células T auxiliares em células Th2 e, dessa maneira, influenciam o desenvolvimento e a intensidade de alergias no trato respiratório e, possivelmente, outras doenças que cursam com esse tipo de resposta.[28]

Há indicações na literatura de que os AGCC também modificam funções efetoras de leucócitos, incluindo fagocitose, produção de espécies reativas de oxigênio e destruição de micro-organismos, o que sugere um efeito imunossupressor. Contudo, mais estudos são necessários para investigar as ações dos AGCC sobre células do sistema imune durante processos infecciosos.

Efeitos sobre o metabolismo energético

Os AGCC afetam o metabolismo energético e podem ser relevantes tanto para o desenvolvimento quanto para a redução do risco da obesidade, da resistência à insulina e do diabete.

Os AGCC têm efeitos benéficos em modelos experimentais de resistência à insulina secundária à obesidade. Nesse contexto, mostrou-se que a administração de AGCC, juntamente com a ração ou oralmente de maneira contínua (adição na água dos animais) ou não (administração da pró-droga de butirato, tributirina, três vezes por semana) a animais que ingerem dietas obesogênicas, faz que eles ganhem menos peso, protegendo-os do desenvolvimento de várias alterações associadas à obesidade, incluindo esteatose hepática, inflamação crônica e resistência à insulina. Efeitos biológicos têm sido relacionados a essa ação protetora dos AGCC, incluindo aumento do gasto energético e da oxidação de lipídios, inibição da inflamação associada à obesidade e produção de hormônios gastrintestinais, incluindo o GLP-1, o qual reduz a ingestão alimentar e melhora a tolerância à glicose. Alterações da termogênese e da função mitocondrial foram descritas como possíveis mecanismos envolvidos no aumento do gasto energético e da oxidação de lipídios pelos AGCC. Em camundongos, mostrou-se que o butirato induz aumento de função e biogênese mitocondrial em músculo esquelético (efeito que parece decorrer de ativação de vias como AMPK, p38MAPK e PGC-1 alfa) e aumento da atividade termogênica do tecido adiposo marrom.[20,29-31]

Recentemente, demonstrou-se que o acetato atravessa a barreira hematoencefálica e atua no hipotálamo, reduzindo a ingestão alimentar e o ganho de peso.[32] Além desse relato do efeito em nível de sistema nervoso central, outros estudos também têm demonstrado que os AGCC

regulam a atividade do sistema nervoso autônomo. Especificamente, os AGCC produzidos e absorvidos logo após a ingestão alimentar aumentam a atividade simpática e, consequentemente, o gasto energético. Por outro lado, em situações de jejum prolongado ou em indivíduos diabéticos, o corpo cetônico beta hidroxibutirato interage com os receptores aos quais os AGCC se ligam, reduz a ativação simpática e, consequentemente, o gasto energético.[33]

Nesse contexto, os AGCC também parecem ser, ao menos em parte, responsáveis pelos efeitos benéficos da ingestão de fibras alimentares, as quais constituem substrato para a fermentação bacteriana e para a formação de AGCC no intestino.[14]

Ações antitumorais dos AGCC

Os AGCC, principalmente o butirato, têm ações antitumorais, as quais têm sido exploradas, principalmente, no caso de tumores que afetam o trato gastrintestinal, em particular o cólon. Os efeitos do butirato incluem inibição da proliferação e da neoangiogênese e indução da diferenciação e da apoptose em células mutadas.[34] Vale ressaltar que esses efeitos de inibição da proliferação celular são seletivos para células tumorais. Em contraste, as células normais do tecido praticamente não são afetadas. Essa seletividade se deve, em parte, às diferenças metabólicas existentes entre as células tumorais e normais. De acordo com Donohoe et al.,[35] o butirato aumenta o crescimento de células epiteliais intestinais por atuar como substrato energético nessas células via betaoxidação e ciclo do ácido tricarboxílico. Esse efeito estimulatório não ocorre em células tumorais em razão do butirato não ser metabolizado de maneira eficiente e se acumular no núcleo dessas células, onde exerce efeitos inibitórios sobre a proliferação celular.

MECANISMOS DE MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR AGCC

Os efeitos dos AGCC sobre células e tecidos no organismo decorrem, ao menos em parte, da ativação de duas principais vias celulares de sinalização:

- Ligação GPCR, como por exemplo o GPR41 e o GPR43.
- Inibição das enzimas histonas desacetilases (HDAC).

Ambos os casos resultam em modificações no padrão de expressão gênica, o que culmina em efeitos celulares. Atualmente, sabe-se que esses mecanismos podem atuar em conjunto e que a ativação de um alvo celular pode levar à modulação do outro, como é o caso do GPR43, que pode modificar a atividade de HDAC.[27] Entretanto, didaticamente, esses mecanismos serão considerados separadamente a seguir.

Receptores acoplados à proteína G

Os AGCC se ligam a GPCR, os quais estão situados na membrana celular e têm como característica o fato de apresentarem sete domínios transmembrana e de interagirem com um conjunto de proteínas triméricas chamadas proteínas G.

As proteínas G têm função essencial na propagação do sinal intracelular mediado pelos GPCR. Nas células existem diferentes classes de proteínas G, as quais estão acopladas aos receptores de membrana. Essas classes, por sua vez, são distinguidas com base nos efetores em que atuam. As principais classes são:

- Proteínas Gs, que estimulam a adenilato ciclase e, com isso, aumentam a produção de AMPc.
- Proteínas Gi, que inibem a adenilato ciclase e abrem canais de potássio (diminuem AMPc e reduzem o potencial de membrana).
- Proteínas Go, que fecham canais de cálcio (diminuem o potencial de membrana).
- Proteínas Gt, que estimulam a fosfodiesterase GMPc (diminuem GMPc).
- Proteínas Gq, que ativam a fosfolipase C, aumentando assim a concentração de inositol trisfosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG)[36] (Figura 9.3).

Após a união do ligante ao GPCR, ocorre uma mudança conformacional que causa a ativação da proteína G. As proteínas G são triméricas (subunidades alfa, beta e gama), e suas funções dependem da dissociação da subunidade alfa em relação ao resto da proteína. Na forma trimérica, a proteína é inativa e permanece ligada ao receptor. Com a ativação do receptor, há uma alteração conformacional e a guanosina difosfato (GDP) da subunidade alfa é substituída por guanosina trifosfato (GTP). Com a ligação do GTP, a subunidade alfa se dissocia da proteína e atua sobre os diferentes efetores. A duração da ativação da proteína G é controlada pela subunidade alfa, a qual possui atividade GTPásica. Quando ela realiza a hidrólise do GTP, a subunidade volta a se ligar ao dímero beta/gama. Em certos casos, o dímero beta/gama também pode ser importante na ativação dos efetores (Figura 9.3).

Os AGCC são capazes de ativar ao menos três receptores do tipo GPCR: o GPR41, também conhecido como receptor de ácidos graxos livres-3 (FFAR3), o GPR43 (FFAR2) e o GPR109A. Esses receptores diferem na dis-

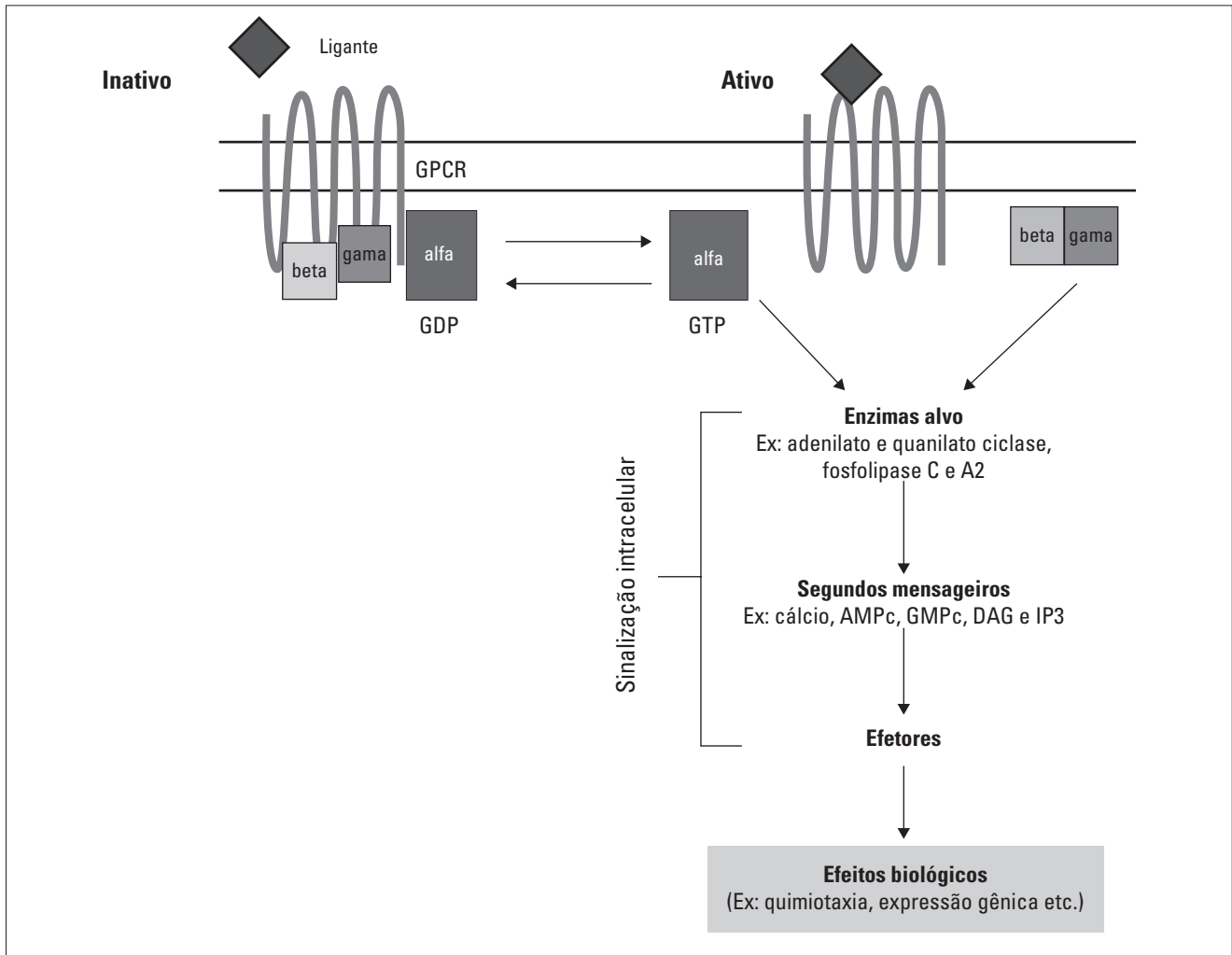



Figura 9.3 Ativação de vias intracelulares por receptores acoplados à proteína G (GPCR). AMPc: adenosina monofosfato cíclica; DAG: diacilglicerol; GDP: guanosina difosfato; GMPc = guanosina monofosfato ciclica; GTP: guanosina trifosfato; IP3: inositol trisfosfato (IP3).

tribuição tecidual, na especificidade de ligante (maior ou menor afinidade por determinado AGCC) e na classe de proteína G na qual estão acoplados, conforme destacado no Quadro 9.1.[1,37] Além disso, diferentes ações dos AGCC têm sido atribuídas a esses receptores.

Inibição de histonas desacetilases (HDAC)

O DNA nuclear encontra-se envolto por uma estrutura formada por proteínas, as chamadas histonas (duas moléculas de cada subunidade H2A, H2B, H3 e H4, descritas em mais detalhes no Capítulo 5). Uma das estratégias utilizadas para modificar a expressão gênica em células eucarióticas envolve a alteração do estado das histonas, sendo a acetilação e a desacetilação dessas proteínas mecanismos envolvidos nesse controle.[44]

O controle desse processo (acetilação e desacetilação) é realizado por enzimas denominadas histonas acetilases ou acetiltransferases (acetilam as histonas) e histonas desacetilases (retiram o grupamento acetil das histonas) (Figura 9.4).[37]

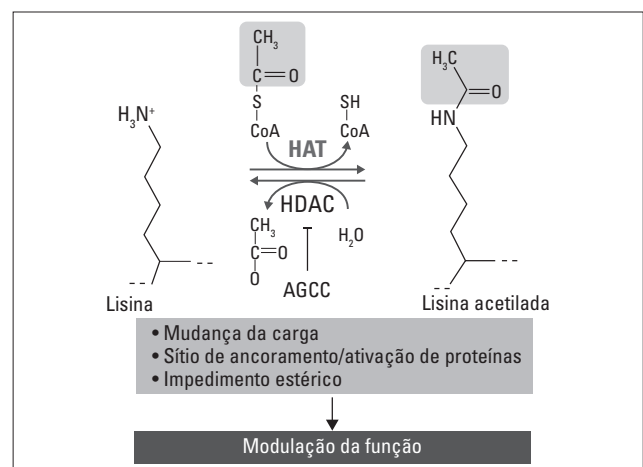



Figura 9.4 Regulação do estado de acetilação de histonas. AGCC: ácido graxo de cadeia curta; HAT = histona acetiltransferase; HDAC = histona desacetilase. **Fonte:** adaptada de Kim e Yang.[38]

Quadro 9.1 Características gerais dos receptores acoplados à proteína G (GPRC) ativados por ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)

	GPR41/FFAR3	GPR43/FFAR2	GPR109A
Distribuição tecidual	Adipócitos e células enteroendócrinas, epiteliais intestinais e neuronais	Adipócitos, leucócitos e células enteroendócrinas e epiteliais intestinais	Adipócitos, leucócitos, células epiteliais intestinais, queratinócitos e hepatócitos
Principais ligantes	Propionato > butirato > acetato	Propionato > acetato = butirato > valerato > formato	Butirato e ácido nicotínico
Via de sinalização intracelular	Proteína Gi/o; vias da adenilato ciclase	Proteína Gi/o e Gq; vias da adenilato ciclase e fosfolipase C	Ativação da proteína Gi/o; vias da adenilato ciclase
Efeitos celulares e teciduais	Liberação de hormônios pelas células enteroendócrinas; ativação do sistema nervoso simpático	Liberação de hormônios pelas células enteroendócrinas; ação quimioatraente em neutrófilos; indução de células Treg; regulação da adipogênese	Ação antitumoral e anti-inflamatória; modulação do metabolismo de lipoproteínas plasmáticas; inibição de lipólise em adipócitos

GPR41/FFAR3: receptor 41 acoplado à proteína G/Receptor de ácidos graxos livres-3; GPR43/FFAR2: receptor 43 acoplado à proteína G/Receptor de ácidos graxos livres-2; GPR109A = receptor 109A acoplado à proteína G.

A acetilação das histonas, em geral, está associada com aumento da expressão gênica. Com a adição do grupo acetila à cadeia lateral das histonas, ocorre diminuição da interação do DNA com essas proteínas em razão da perda da carga positiva (diminuição da afinidade eletrostática) e por impedimento estérico. As consequências dessa modificação (adição de grupo acetil a lisinas das histonas) são maior grau de descompactação da cromatina e favorecimento da ligação de fatores de transcrição. Por isso, em geral, a acetilação está relacionada com aumento de expressão gênica, ao passo que a desacetilação (catalisada pelas HDAC) relaciona-se com a redução da transcrição gênica. Contudo, essa lógica não se aplica a todos os genes, o que, em parte, decorre de outras proteínas também terem suas funções reguladas por acetilação/desacetilação, incluindo fatores de transcrição. Fatores de transcrição como o NF-kB também são reversivelmente acetilados, processo que modifica as suas funções e atividades.[39]

Os AGCC butirato e propionato têm capacidade de inibir a atividade de histonas desacetilases (HDAC) e, com isso, aumentar o estado de acetilação de histonas e de proteínas não histonas. Efeitos biológicos dos AGCC, como as ações anti-inflamatória e antitumoral, têm sido atribuídos à sua atuação inibitória sobre as HDAC.[1,22,34]

ESTUDOS REALIZADOS COM ADMINISTRAÇÃO DE AGCC OU DE SUAS FONTES

Estudos têm sido conduzidos em animais de experimentação e em seres humanos com o intuito de determinar os efeitos *in vivo* dos AGCC e de utilizar-se de suas propriedades na redução do risco ou no tratamento de doenças. A aplicação tanto dos AGCC isoladamente quanto em mistura, ou de métodos que aumentam sua produção intestinal (incluindo probióticos, prebióticos ou simbióticos), tem apresentado resultados interessantes em algumas condições clínicas. A seguir estão apresentados, resumidamente, os resultados de alguns desses estudos.

Câncer

Conforme discutido anteriormente, os AGCC, particularmente o butirato, apresentam efeitos antitumorais demonstrados por estudos conduzidos *in vitro*. Dados de estudos epidemiológicos também evidenciam possível relação entre os AGCC e redução do risco de determinados tipos de tumores. Nesse contexto, Bingham et al.[40] mostraram relação inversa entre o consumo de fibras (fontes de AGCC) e a incidência de câncer colorretal. Outros autores sugeriram ainda que o consumo de fibras e, possivelmente, a produção e absorção de AGCC também reduzam a incidência ou agressividade de tumores de mama e próstata.[41,42] Vale ressaltar que, mesmo para

tumores intestinais, ainda não há consenso na literatura com respeito ao efeito das fibras e dos AGCC. Além disso, outro ponto importante a ser considerado é que os AGCC são um possível, mas não único, elo entre os efeitos das fibras sobre a incidência de neoplasias. São necessários mais estudos para entender melhor essa relação em humanos.

A aplicação isolada de AGCC, via oral, por meio de enemas ou infusão colônica, foi investigada em modelos animais de carcinogênese colorretal. Apesar de alguns trabalhos mostrarem benefícios desse tratamento, em geral, há grande variação nos resultados obtidos, o que dificulta a sua interpretação, além de não haver estudos em seres humanos.[43]

Em razão da rápida metabolização do butirato, alternativas incluindo análogos/pró-drogas (p. ex., tributirina), uso de sistemas de entrega de fármacos como nanopartículas lipídicas e, principalmente, moléculas sintéticas que atuam seletivamente sobre alvos dos AGCC, como as histonas desacetilases (p. ex., vorinostat), têm sido exploradas no tratamento de diversos tipos de tumores. Nesse contexto, vale ressaltar os resultados promissores que têm sido obtidos com o uso de inibidores de histonas desacetilases no tratamento de diferentes tipos de tumores, incluindo linfomas, tumor de próstata, alguns tipos de leucemias, mieloma, entre outros,[44] bem como com a utilização da tributirina em modelo animal de hepatocarcinoma.[45,46] Nesses últimos trabalhos, tem-se mostrado que a administração oral de tributirina aumenta a acetilação de histonas e proteínas não histonas, incluindo p21 e p53, alterações que podem ser relevantes para a proteção observada com esse tratamento.

Doença inflamatória intestinal

As ações anti-inflamatórias dos AGCC têm sido exploradas em modelos experimentais de doença inflamatória intestinal (DII). As justificativas para a realização desses estudos incluem o fato de que pacientes com DII apresentam menores concentrações ou alterações na capacidade de metabolização dos AGCC, além disso, esses compostos, conforme discutido anteriormente, têm papel fundamental na manutenção das células epiteliais intestinais e apresentam importantes efeitos anti-inflamatórios.

Em camundongos, os AGCC apresentam efeitos protetores em modelos de colite.[25,27] Apesar de mais estudos em seres humanos serem necessários, observou-se que a aplicação de AGCC na forma de enema ou irrigação colônica pode ser benéfica no tratamento de alguns casos de colite ulcerativa em humanos.[47]

Obesidade e resistência à insulina

A administração de AGCC, conforme discutido anteriormente, protege os animais do desenvolvimento de obesidade, da resistência à insulina e de outras alterações metabólicas secundárias ao maior ganho de peso.

Esses efeitos têm sido observados não apenas em estudos com administração isolada desses compostos, mas também em trabalhos nos quais foram administrados substratos para a geração de AGCC no trato gastrintestinal (fibras, prebióticos), bactérias (probióticos) que atuam no intestino aumentando a produção de AGCC ou ambos (simbióticos).[48] Nesse sentido, grupos de pesquisa têm focado seus esforços na identificação dos mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos desses produtos do metabolismo bacteriano com o intuito de desenvolver novas abordagens para a redução do risco ou para o tratamento de alterações secundárias ao ganho excessivo de peso.

Sepse, suas complicações e uso de AGCC na nutrição parenteral

Estudos têm sido conduzidos no sentido de investigar a possível aplicação de AGCC em indivíduos com sepse, condição caracterizada por resposta exacerbada e potencialmente fatal do sistema imune diante de infecção. Embora os estudos tenham sido realizados apenas em modelos animais de sepse e endotoxemia, os resultados são animadores. De acordo com Zhang et al.,[49] a administração intravenosa de butirato de sódio reduz a mortalidade em animais nos quais se induz sepse por ligação e punção cecal. Nesse estudo, verificou-se redução de danos em órgãos importantes como fígado, rins e pulmões, resultando, consequentemente, em maior taxa de sobrevivência dos animais tratados com butirato. Além do efeito protetor da administração intravenosa, a administração oral de butirato de sódio ou de tributirina (triacilglicerol formado por três moléculas de butirato ligadas ao glicerol) também protegeu animais contra lesões teciduais decorrentes da administração intravenosa de LPS (modelo de endotoxemia).[50] Resultados promissores também têm sido obtidos com o uso de butirato em modelos experimentais de lesão pulmonar aguda decorrente de sepse. Nesse quadro, a administração de butirato de sódio reduziu o recrutamento de leucócitos para os pulmões e, consequentemente, as lesões pulmonares.[51]

Em seres humanos, a administração de dieta enteral suplementada com butirato e outros nutrientes com ações imunomodulatórias, incluindo glutamina, antioxidantes e vitaminas, para pacientes com diagnóstico de

sepse resultou em recuperação mais rápida, apesar de não afetar outros parâmetros, como o número e tipo de infecções secundárias e a taxa de mortalidade.[52]

Outra possível aplicação dos AGCC que tem sido explorada por alguns grupos de pesquisa é sua administração parenteral. Em animais, demonstrou-se que a adição de butirato à alimentação parenteral resulta em redução da atrofia da mucosa intestinal e em melhora significativa da imunidade de mucosas, incluindo aumento do número de linfócitos nas placas de Peyer e das concentrações de IgA no lúmen intestinal em comparação com animais que receberam dieta parenteral sem butirato.[53]

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os AGCC são compostos predominantemente gerados no trato gastrintestinal durante o processo de fermentação bacteriana. Apresentam uma miríade de efeitos que decorrem de ações em diferentes alvos celulares, incluindo os GPRC (GPR41, 43 e 109b) e as enzimas HDAC. Esses produtos do metabolismo bacteriano têm ações em diversos tecidos e células, incluindo leucócitos, células epiteliais intestinais, fígado, tecido adiposo e sistema nervoso. As principais ações que têm sido atribuídas aos AGCC incluem atenuação da inflamação, manutenção da homeostase intestinal, regulação do metabolismo e inibição da proliferação de células tumorais. Apesar de mais trabalhos serem necessários, há indicações de que, em razão dessas ações, os AGCC possam ser utilizados na redução do risco de doenças inflamatórias e de tumores, bem como do desenvolvimento de obesidade e suas comorbidades.

REFERÊNCIAS

1. Tan J, McKenzie C et al. The role of short-chain fatty acids in health and disease. Advances in Immunology. 2014;121:91-119.
2. Siler SQ, Neese RA et al. De novo lipogenesis, lipid kinetics, and whole-body lipid balances in humans after acute alcohol consumption. Am J Clin Nutr. 1999;70(5):928-36.
3. Wolever TM, Josse RG et al. Time of day and glucose tolerance status affect serum short-chain fatty acid concentrations in humans. Metabolism. 1997;46(7):805-11.
4. Scheppach W, Pomare EW et al. The contribution of the large intestine to blood acetate in man. Clin Sci (Lond). 1991;80(2):177-82.
5. MacFarlane S, Macfarlane GT. Regulation of short-chain fatty acid production. The Proceedings of the Nutrition Society. 2003;62(1):67-72.
6. Wong JM, Souza R et al. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. J Clin Gastroenterol. 2006;40(3):235-43.
7. Topping DL, Clifton PM. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. Physiol Rev. 2001;81(3):1031-64.
8. Hooper LV, Midtvedt T et al. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. Annu Rev Nutr. 2002;22:283-307.
9. Ruppin H, Bar-Meir S et al. Absorption of short-chain fatty acids by the colon. Gastroenterology. 1980;78(6):1500-07.
10. McNeil NI, Cummings JH et al. Short chain fatty acid absorption by the human large intestine. Gut. 1978;19(9):819-22.
11. Clausen MR, Bonnen H et al. Colonic fermentation to short-chain fatty acids is decreased in antibiotic-associated diarrhea. Gastroenterology. 1991;101(6):1497-504.
12. Binder HJ. Role of colonic short-chain fatty acid transport in diarrhea. Annu Rev Physiol. 2010:72:297-313.
13. Cook SI, Sellin JH. Review article: short chain fatty acids in health and disease. Aliment Pharmacol Ther. 1998;12(6):499-507.
14. Wolever TM, Schrade KB et al. Do colonic short-chain fatty acids contribute to the long-term adaptation of blood lipids in subjects with type 2 diabetes consuming a high-fiber diet? Am J Clin Nutr. 2002;75(6):1023-30.
15. Cummings JHR, Rombeau JL, Sakata T. Physiological and clinical aspects of short chain fatty acids. Cambridge: Cambridge University Press; 1995.
16. Akanji AO, Hockaday TD. Acetate tolerance and the kinetics of acetate utilization in diabetic and nondiabetic subjects. Am J Clin Nutr. 1990;51(1):112-18.
17. Wolever TM, Spadafora P et al. Interaction between colonic acetate and propionate in humans. Am J Clin Nutr. 1991;53(3):681-87.
18. Vogt JA, Pencharz PB et al. L-Rhamnose increases serum propionate in humans. Am J Clin Nutr. 2004;80(1):89-94.
19. Suzuki T, Yoshida S et al. Physiological concentrations of short-chain fatty acids immediately suppress colonic epithelial permeability. British Journal of Nutrition. 2008;100(2):297-305.
20. Tolhurst G, Heffron H et al. Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2. Diabetes. 2012;61(2):364-71.
21. Cherbut C, Ferrier L, et al. Short-chain fatty acids modify colonic motility through nerves and polypeptide YY release in the rat. Am J Physiol. 1998;275(6 Pt 1):G1415-1422.
22. Vinolo MA, Rodrigues HG et al. Regulation of inflammation by short chain fatty acids. Nutrients. 2011;3(10):858-76.
23. Kovarik JJ, Holzl MA et al. Eicosanoid modulation by the short-chain fatty acid N-butyrate in human monocytes. Immunology. 2013;139(3):395-405.
24. Cox MA, Jackson J et al. Short-chain fatty acids act as antiinflammatory mediators by regulating prostaglandin E(2) and cytokines. World J Gastroenterol. 2009;15(44):5549-57.
25. Singh N, Gurav A et al. Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. Immunity. 2014;40(1):128-39.
26. Furusawa Y, Obata Y et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. Nature. 2013;504(7480):446-50.
27. Smith PM, Howitt MR et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. Science. 2013;341(6145):569-73.
28. Trompette A, Gollwitzer ES et al. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. Nat Med. 2014;20(2):159-66.
29. Lin HV, Frassetto A et al. Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms. PloS One. 2012;7(4):e35240.

30. Vinolo MA, Hirabara SM et al. G-protein-coupled receptors as fat sensors. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care. 2012;15(2):112-16.
31. Gao Z, Yin J et al. Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. Diabetes. 2009:58(7):1509-17.
32. Frost G, Sleeth ML et al. The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. Nature Communications. 2014;5:3611.
33. Kimura I, Inoue D, et al. Short-chain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via G protein-coupled receptor 41 (GPR41). Proc Natl Acad Sci USA. 2011;108(19):8030-35.
34. Fung KYC, Cosgrove L et al. A review of the potential mechanisms for the lowering of colorectal oncogenesis by butyrate. British Journal of Nutrition. 2012;108(5):820-31.
35. Donohoe DR, Collins LB, et al. The Warburg effect dictates the mechanism of butyrate-mediated histone acetylation and cell proliferation. Moll Cell. 2012;48(4):612-26.
36. Fanelli F, Felline A, Raimondi F, Seeber M. Structure network analysis to gain insights into GPCR function. Biochem Soc Trans. 2016 Apr 15;44(2):613-8.
37. Vinolo MA, Rodrigues H et al. Tributyrin attenuates obesity-associated inflammation and insulin resistance in high-fat fed mice. American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism. 2012;303:E272-E282.
38. Kim GW, Yang XI. Comprehensive lysine acetylomes emerging from bacteria to humans. Trends Biochem Sci. 2011; 36(4): 211-20.
39. Vinolo MA, Rodrigues HG, Hatanaka E, Sato FT, Sampaio SC, Curi R. Suppressive effect of short chain fatty acids on production of proinflammatory mediators by neutrophils. J. Nutr. Biochem. 2011;22:849-855.
40. Bingham SA, Day NE et al. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. Lancet. 2003;362(9388):1000.
41. Tabung F, Steck SE et al. Intake of grains and dietary fiber and prostate cancer aggressiveness by race. Prostate Cancer. 2012;2012:323296.
42. Dong JY, He K et al. Dietary fiber intake and risk of breast cancer: a meta-analysis of prospective cohort studies. American Journal of Clinical Nutrition. 2011:94(3):900-05.
43. Sengupta S, Muir JG et al. Does butyrate protect from colorectal cancer? Journal of Gastroenterology and Hepatology. 2006;21(1 Pt 2):209-18.
44. West AC, Johnstone RW. New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment. J Clin Invest. 2014;124(1):30-39.
45. de Conti A, Tryndyak V et al. The chemopreventive activity of the butyric acid prodrug tributyrin in experimental rat hepatocarcinogenesis is associated with p53 acetylation and activation of the p53 apoptotic signaling pathway. Carcinogenesis. 2013;34(8):1900-06.
46. Kuroiwa-Trzmielina J, Conti A et al. Chemoprevention of rat hepatocarcinogenesis with histone deacetylase inhibitors: efficacy of tributyrin, a butyric acid prodrug. International Journal of Cancer. Journal International du Cancer. 2009;124(11):2520-27.
47. Breuer RI, Soergel KH et al. Short chain fatty acid rectal irrigation for left-sided ulcerative colitis: a randomised, placebo controlled trial. Gut. 1997;40(4):485-91.
48. Delzenne NM, Neyrinck AM et al. Targeting gut microbiota in obesity: effects of prebiotics and probiotics. Nature Rev Endocrinology. 2011;7(11):639-46.
49. Zhang LT, Yao YM, Lu JQ, Yan XJ, Yu Y, Sheng ZY. Sodium butyrate prevents lethality of severe sepsis in rats. Shock. 2007 Jun;27(6):672-7.
50. Miyoshi M, Sakaki H et al. Oral administration of tributyrin increases concentration of butyrate in the portal vein and prevents lipopolysaccharide-induced liver injury in rats. Clinical Nutrition. 2011;30(2):252-58.
51. Ni YF, Wang J et al. Histone deacetylase inhibitor, butyrate, attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. Respiratory Research. 2010;11:33.
52. Koretz RL Early enteral supplementation with key pharmaconutrients improves sequential organ failure assessment score in critically ill patients with sepsis: outcome of a randomized, controlled, double-blind trial. Nutrition in Clinical Practice. 2008;23(4):447-49.
53. Murakoshi S, Fukatsu K et al. Effects of adding butyric acid to PN on gut-associated lymphoid tissue and mucosal immunoglobulin A levels. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition. 2011;35(4):465-72.

10 Ácidos graxos poli-insaturados

Dennys Esper Cintra
Mônica Yamada
Marcelo Macedo Rogero

INTRODUÇÃO

Do ponto de vista biológico, os lipídios são essenciais para a sobrevivência humana. Eles contribuíram fundamentalmente para a evolução das espécies, tanto pelo seu papel biológico quanto estratégico, no que se refere ao seu conteúdo calórico ou ao aumento da durabilidade de alimentos com alto teor desse nutriente.

Uma das funções dos lipídios recentemente descoberta refere-se ao seu papel como componente principal da grande massa tecidual que respondia pela manutenção sistêmica da vida de seres como a drosófila. Conhecido como "corpo gorduroso" e representando mais de 80% do corpo do inseto, esse tipo de tecido adiposo ancestral era responsável por funções como manutenção energética e hormonal, mas principalmente pelo controle do sistema imune. Com a evolução, o cruzamento entre espécies resultou na especialização desses sistemas descritos, separando essas funções. Com isso, diferentes espécies começaram a apresentar sistemas isolados responsáveis por controle energético, circulatório, linfático, imunológico, entre outros.

Em algum momento da escala evolutiva, tais características cruzaram com as humanas, contribuindo para a alta especialização dos sistemas, assim como é conhecido atualmente. Por exemplo, tinha-se a compreensão sobre o tecido adiposo humano apenas como um órgão de estoque. Após avaliar a capacidade secretória desse tecido e encontrar substâncias que não eram derivadas de lipídios, com capacidade de atuar em outros sistemas, compreendeu-se também a função endócrina desse tecido. Essa característica parece se tratar de um resquício evolutivo, o que ajuda a explicar a participação do sistema imune nesse tecido.[1,2]

Já com a espécie humana bem definida evolutivamente, os lipídios novamente apresentaram papel impactante no avanço das civilizações, quando utilizados como conservantes de alimentos. As carnes de caça, mesmo depois de submetidas ao cozimento, apresentavam curta durabilidade; todavia, com a imersão da carne na gordura, seu tempo de validade aumentava de forma significativa, criando oportunidades de simplificação da vida para a época e contribuindo para as expansões civilizatórias.[3]

Ainda há diversos outros marcos históricos relacionados à importância dos lipídios para o ser humano, mas talvez o principal destaque seja a função energética que essas substâncias conferiram aos humanos, garantindo fornecimento considerável de calorias em condições desfavoráveis, como nos momentos de escassez de alimentos. No entanto, com o avanço das características da civilização, a forma como os lipídios têm sido utilizados na alimentação desregula a homeostase metabólica em vários níveis, trazendo diversas implicações à saúde. No caso dos lipídios, o consumo elevado desse nutriente tem gerado prejuízo das condições de saúde, de grande impacto epidemiológico.[4]

Em tempos modernos, com o avanço da ciência da nutrição, houve a compreensão de que os lipídios apresentavam estrutura complexa e não poderiam ser tratados de forma generalizada. Nesse sentido, os lipídios foram sistematizados em "famílias", de acordo com o tamanho de suas cadeias carbônicas. Sua unidade fundamental é chamada de ácido graxo e, portanto, surgiram os termos ácidos graxos de cadeia curta (2-4 carbonos), média (6-12 carbonos), longa (14-20 carbonos) e muito longa (>22 carbonos). Há pequenas divergências na literatura científica no que diz respeito ao tamanho das

cadeias carbônicas; no entanto, e de forma geral, os tamanhos aqui propostos são os de ocorrência mais frequente. Posteriormente, foi notada a presença de uma ou mais duplas ligações (insaturações) entre essas cadeias carbônicas, o que culminou em nova nomenclatura para os ácidos graxos, consecutivamente chamados de ácidos graxos mono (uma insaturação) ou poli-insaturados (duas ou mais insaturações). Essas características são bem aceitas atualmente; no entanto, as funções no organismo de mamíferos exercidas por tais substâncias são completamente diferentes, até mesmo entre classes iguais de lipídios. Sendo assim, mais uma vez, com o avanço científico, demonstrou-se que os lipídios não podem mais ter sua interpretação biológica atrelada apenas às suas classificações químicas que os inserem dentro de um grupo ou família de substâncias.

Há menos de uma década, acreditava-se que os ácidos graxos saturados, mono ou poli-insaturados, apresentavam respostas biológicas padronizadas de acordo com a família à qual pertenciam. Em geral, profissionais da saúde incentivaram substituições das gorduras saturadas da alimentação pelas monoinsaturadas ou poli-insaturadas, visto que as saturadas apresentavam alta correlação com diversos tipos de doenças. No entanto, posteriormente, observou-se que ácidos graxos de cadeia curta, mas também saturados, apresentavam respostas biológicas muito interessantes para a saúde. Portanto, começou-se a questionar se todas as gorduras saturadas seriam prejudiciais à saúde. Essas mesmas perguntas foram feitas em relação aos demais tipos de lipídios.

Ácidos graxos poli-insaturados

Os ácidos graxos poli-insaturados são primariamente reconhecidos como pertencentes às famílias do ômega 3 ou do ômega 6. Entre os componentes dessas famílias destacam-se os ácidos graxos alfa-linolênico (ALA – C18:3), eicosapentaenoico (EPA – C22:5) e docosa-hexaenoico (DHA – C24:6) como os principais constituintes da família dos ômega 3. A família dos ácidos graxos ômega 6 é composta principalmente pelos ácidos graxos linoleico (AL – C18:2) e araquidônico (AA – C20:4). A abreviação que segue à frente do nome do ácido graxo indica o número de carbonos e o número de duplas ligações dessa molécula; por exemplo, o C20:4 possui uma estrutura que contém 20 carbonos e 4 duplas ligações.

Já a nomenclatura ômega vem do grego ω e indica a última letra desse alfabeto. Nomenclaturas específicas para ácidos graxos essenciais foram criadas para diferenciar tais substâncias conforme seu grau de insaturação, diferentemente da convenção de Genebra. Tal proposição visava alterar a numeração do posicionamento das insaturações da molécula: em vez de iniciar essa numeração a partir do radical carboxila (COOH), o sentido foi invertido, numerando-se a partir do primeiro carbono insaturado, justaposto ao grupamento metílico (CH_3). Assim, ácidos graxos poli-insaturados são classificados como “ômega 3” quando a primeira insaturação está inserida entre os carbonos 3 e 4, a partir do grupo metil; da mesma forma, quando a dupla ligação está inserida entre os carbonos 6 e 7, denomina-se “ômega 6”. Em termos de nomenclatura, é importante destacar dois outros ácidos graxos não essenciais, mas que respeitam a mesma regra: o ácido graxo “ômega 7”, com inserção da dupla ligação entre os carbonos 7 e 8, e o ácido graxo “ômega 9”, com inserção da dupla ligação entre os carbonos 9 e 10 a partir do grupo metil. Esses últimos ácidos graxos podem ser sintetizados em mamíferos a partir de dessaturases específicas. Uma coincidência estrutural ocorre entre os ácidos graxos alfa-linolênico e gama-linolênico, o que causa certo grau de confusão, inclusive em artigos científicos. Ambos possuem 18 carbonos e 3 duplas ligações; no entanto, o alfa-linolênico é integrante da família do ômega 3, enquanto o gama-linolênico, da família ômega 6.

Essencialidade dos ácidos graxos ômega 3 e ômega 6

Ambos os ácidos graxos ômega 3 e 6 são essenciais à vida humana e animal. A necessidade de busca por esses nutrientes em fontes alimentares se deve à incapacidade de sua síntese por mamíferos, por limitações em suas vias biossintéticas. O ácido palmítico (C16:0) pode ser sintetizado endogenamente – síntese *de novo* – a partir da molécula de acetil-CoA. Esse ácido graxo pode ainda ser alongado por enzimas chamadas elongases, que inserem novos carbonos na molécula. Com 18 carbonos, essa estrutura ganha o nome de ácido esteárico. Ainda, outras enzimas, como a delta-9-dessaturase, podem atuar nessa mesma estrutura, inserindo duplas ligações e, portanto, dessaturando a molécula. Assim, nessa sequência, tem-se o ácido oleico, com 18 carbonos e uma dupla ligação (C18:1), sendo este o ponto limitante da síntese de ácidos graxos insaturados em mamíferos.[5]

Nos vegetais, a enzima delta-12-dessaturase converte o ácido graxo oleico em linoleico (C18:2), e a delta-15-dessaturase converte o ácido graxo linoleico em alfa-linolênico (C18:3). Uma vez que tais produtos são consumidos por mamíferos, o processo de biossíntese, com elongações e dessaturações, continua. Resumidamente, o ácido linoleico sofre esses processos até dar origem ao ácido graxo araquidônico (C20:4). Da mesma forma, o ácido alfa-linolênico é bioconvertido a dois importantes ácidos graxos, o EPA (C20:5) e o DHA (C22:6).

No entanto, ainda há muita discussão sobre a efetividade metabólica na conversão do ácido alfa-linolênico em EPA e DHA, acreditando-se que não ultrapasse os 15%. De forma geral, a literatura aponta para efetividade entre 5 e 15% de bioconversão. Portanto, a ingestão dos ácidos graxos EPA e DHA deve ser complementada pelo consumo de alimentos fontes desses nutrientes.[6]

Além dos pontos limitantes bioquímicos envolvidos na síntese dos ácidos graxos, os produtos da metabolização dos ácidos graxos ômega 3 e 6 são outro ponto de extrema importância, justificando sua essencialidade. Após serem absorvidos pelas células, esses ácidos graxos sofrem diversos processos metabólicos, gerando substâncias fundamentais à vida humana. Entre essas substâncias estão os autacoides, que são metabólitos fundamentais para várias funções orgânicas, entre elas a manutenção do sistema imune e a síntese de leucotrienos, de prostaglandinas, de prostaciclinas e de tromboxanos.[7]

Em 1979, Dyerberg e Bang[8] constataram que os esquimós da Groenlândia apresentavam baixa incidência de doenças coronarianas em comparação às demais populações mundiais. Após anos de investigação, observou-se que essa população tinha hábito alimentar peculiar, com alto consumo de peixes, focas e outros animais marinhos que, naquela região, são riquíssimos em ácidos graxos ômega 3. Apesar de terem estabelecido correlação interessante entre a baixa incidência de mortes por doenças cardiovasculares e o alto consumo de alimentos ricos em ômega 3, ainda se desconhecia os possíveis mecanismos controladores desse fenômeno.

Todavia, os pesquisadores notaram alta mortalidade por hemorragia e, poucos anos depois, identificaram os eicosanoides como participantes desse processo, sendo um deles o tromboxano A2 (TXA2), que é responsável por induzir agregação plaquetária, ao mesmo tempo em que tem sua produção reduzida competitivamente pelos ácidos graxos ômega 3. Seguindo essa lógica, anos mais tarde adotou-se a ingestão de ácidos graxos ômega 3 como estratégia nutricional para tratamentos de enfermidades relacionadas a eventos tromboembólicos, nos quais o ômega 3 demonstrou potente atividade trombolítica justamente por inibir a síntese do tromboxano A2 em detrimento da produção do tromboxano A3. Os ácidos graxos ômega 6 também compõem esse mecanismo, no entanto, com funções também bastante específicas. Tal descrição ilustra um período crítico e interessante no descobrimento da função desses mediadores lipídicos; contudo, a atividade das prostaglandinas, a qual se descreve a seguir, é de fundamental importância.[8]

Biossíntese das prostaglandinas

No que se refere ao estudo das prostaglandinas, destaca-se o mecanismo de ação do fármaco mais conhecido no mundo, o ácido acetilsalicílico (AAS). Hipócrates já havia descrito que as cascas da árvore do salgueiro (da família das *Salicaceae*), quando colocadas sobre as feridas dos enfermos da época (1300 a.C.), promoviam rápido alívio da dor e supressão da febre. No século XIX, outros sintomas, além da dor, foram atrelados à melhora das enfermidades, como calor, rubor e tumor no local da lesão.[9] Ao longo do século XX, muito se especulou sobre a forma de ação do AAS e investigou-se sobre sua participação também na via das prostaglandinas, a qual também foi e continua sendo bastante investigada.[10]

A história mecanística dos derivados dos salicilatos, assim como dos derivados lipídicos, está interligada. Fisiologicamente, é necessária a entrada de ácidos graxos na célula para a produção de mediadores importantes. Os principais ácidos graxos componentes da membrana celular são o ácido araquidônico (AA) e o EPA. Por intermédio da enzima fosfolipase A2 (PLA2), tais ácidos graxos são desprendidos dos fosfolipídios da membrana e liberados para o interior da célula. A demanda desse processo está relacionada ao tipo e à quantidade de ácidos graxos presentes na alimentação do indivíduo. O AA é o principal constituinte dos fosfolipídios de membrana; no entanto, caso o consumo de EPA seja elevado, isso será refletido na redução da razão AA:EPA na membrana plasmática. Uma vez disponível no interior da célula, cada molécula poderá ser convertida em eicosanoides específicos.[11,12]

O AA pode ser bioconvertido por duas enzimas específicas, a lipoxigenase (LIPOOX) ou a ciclo-oxigenase-1 (COX-1). Quando bioconvertido pela LIPOOX, dará origem aos leucotrienos, substâncias envolvidas em diversas etapas na regulação do sistema imune. Entre os principais leucotrienos estão o hidroxieicosatetraenoico (HETE), o hidroxiperoxieicosatetraenoico (HPETE), os leucotrienos das séries A (LTA_4), B (LTB_4) e C (LTC_4), entre outros. Cada substância apresenta atividade específica, como capacidade de promover adesão e quimiotaxia de leucócitos, fagocitose, liberação de espécies reativas de oxigênio, entre outras. Caso o AA seja convertido pela enzima COX-1, será transformado nos eicosanoides prostaglandinas (PGE_2), prostaciclinas (PGI_2) e tromboxanos (TXA_2). Da mesma forma, essas substâncias têm atividades específicas, como controle da vasodilatação ou da vasoconstrição, broncodilatação, ativação de células polimorfonucleares, agregação plaquetária, entre outras. Cabe destacar que existem "séries" que determinam a funcionalidade de tais substâncias (leucotrienos ou prostaglandinas), as quais são classificadas como par (2 e 4) ou ímpar (3 e 5).

Similarmente, ácidos graxos do tipo EPA podem ser substratos das mesmas enzimas, LIPOOX e COX-1. No entanto, quando isso ocorre, o produto final apresenta grande semelhança, porém pequenas modificações em sua estrutura química, o que altera de forma significativa sua ação final, em comparação aos derivados do AA. Portanto, eicosanoides derivados do EPA por meio da ação da LIPOOX originam os leucotrienos HETE, HPETE, LTA_5, LTB_5, LTC_5, entre outros, porém de série ímpar. Do mesmo modo, quando o EPA é substrato da COX-1, é convertido em prostaglandinas e leucotrienos de série ímpar, como a PGE_3, a PGI_3 e o TXA_3 (Figura 10.1).

Essa alteração na série determina mudança na estrutura dos eicosanoides; mais especificamente, o ponto de inserção de algumas duplas ligações na molécula é alterado. Cabe destacar que, embora a alteração na configuração da molécula seja pequena, o impacto na função dessas substâncias é muito importante, como descrito a seguir. Além disso, apesar de terem sido transformadas em outras substâncias, todas elas possuem características de lipídios, pois foram modificadas pela LIPOOX ou pela COX-1 a partir do AA ou do EPA.

Por meio da suplementação parenteral ou enteral de ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 ocorre o aumen-

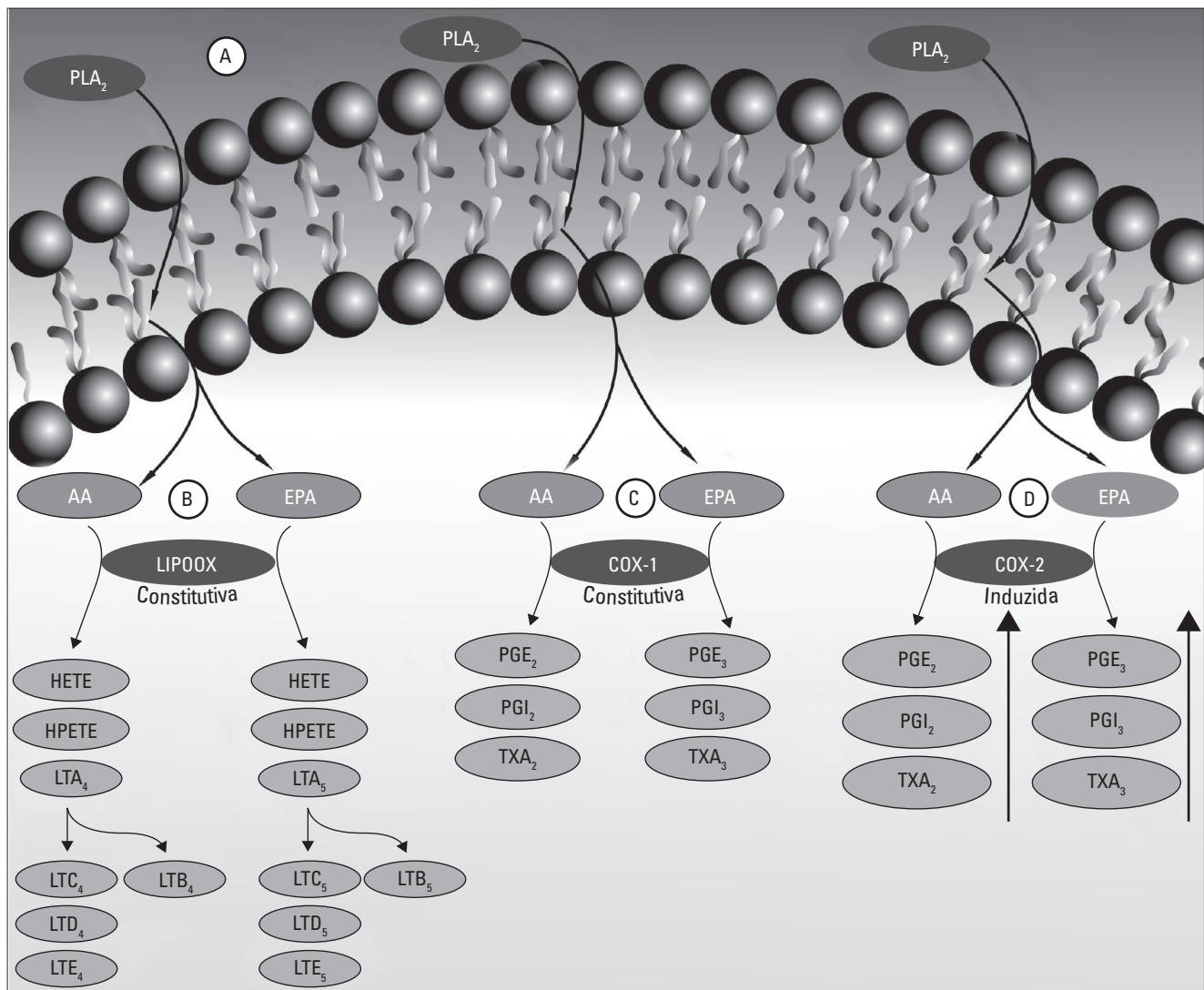



Figura 10.1 Produção dos eicosanoides biossinteticamente derivados de ácidos graxos poli-insaturados ômega 6 e ômega 3. A: A enzima fosfolipase A2 (PLA_2) removendo do fosfolipídio moléculas de ácidos graxos para o interior celular. B: Após a liberação do ácido graxo para o interior da célula, tanto o ácido graxo araquidônico (AA) como o eicosapentaenoico (EPA) podem ser biocorvertidos em leucotrienos (LT) pela enzima lipoxigenase (LIPOOX), com os derivados do AA dando origem a subprodutos de série par (4) e os do EPA, a subprodutos de série ímpar (5). C: Ciclo-oxigenase 1 (COX-1) é uma enzima constitutiva dos tecidos em qualquer situação, convertendo AA e EPA em subprodutos específicos chamados de prostaglandinas (PGE). Como em B, tais substâncias também carregam características da estrutura de seus antecessores, sendo, portanto, os derivados do AA de série par (2) e os do EPA de série ímpar (3). D: A enzima ciclo-oxigenase 2 (COX-2) é induzida por estresse tecidual, principalmente pela inflamação. Mais potente que a COX-1, a COX-2 tem alta capacidade de conversão dos ácidos graxos em prostaglandinas. Contudo, as prostaglandinas derivadas do EPA possuem efeitos antagônicos aos do AA. HETE: hidroxieicosatetraenoico; HPETE: hidroxiperoxieicosatetraenóico; PGI: prostaciclina; TXA: tromboxanos.

to da razão ômega 3:ômega 6 nos fosfolípidios presentes na membrana celular de diversos tecidos. Estudos demonstraram que o pré-tratamento dietético com ômega 3 influencia favoravelmente a resposta fisiopatológica a endotoxinas e exerce efeito modulatório relevante sobre a biologia de citocinas e eicosanoides.[13] A via mais comum pela qual lipídios podem modular a biologia de citocinas pró-inflamatórias refere-se à alteração da composição de ácidos graxos da membrana celular. Como consequência dessa alteração, dois fenômenos inter-relacionados podem ocorrer: a alteração da fluidez da membrana e a alteração nos produtos que surgem a partir da hidrólise dos fosfolípidios de membrana.[14]

Alterações na constituição de fosfolípidios de membrana influenciam diretamente a síntese de mediadores derivados de lipídios, como os eicosanoides. Sendo assim, a suplementação de ômega 3 provoca competição entre o EPA e o AA como precursores da síntese desses eicosanoides. Essa competição favorece a síntese de prostaglandinas e leucotrienos das séries 3 e 5, respectivamente, em detrimento de prostaglandinas e trombroxanos da série 2 e leucotrienos da série 4, os quais apresentam propriedades pró-inflamatórias mais marcantes.[15,16] Portanto, o AA é potencialmente pró-inflamatório, enquanto a presença de ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 limita esse efeito, uma vez que prostaglandinas e tromboxanos de séries 3 e leucotrienos de séries 5 apresentam potencial pró-inflamatório reduzido. Cabe ressaltar que a imunomodulação exercida por ácidos graxos poli-insaturados é dependente da razão ômega 3:ômega 6 presente em emulsões lipídicas. Uma razão ômega 3:ômega 6 balanceada de 1:2 não prejudica a resposta imune, ao passo que quantidade elevada de ômega 3 ou ômega 6 exerce efeitos imunossupressores.[15,17,18]

O processo inflamatório clássico e a participação das prostaglandinas

São várias as características que elucidam o processo inflamatório tradicional, que apresenta quatro sinais cardinais: dor, calor, rubor e tumor. Descreve-se aqui, brevemente, a participação das prostaglandinas nesse processo.

Quando um tecido é afetado a ponto de desencadear uma resposta pró-inflamatória intensa, como quando há a penetração de objeto perfurocortante na pele, quase imediatamente observam-se as características inflamatórias mencionadas. Nesse contexto, a enzima responsável pela intensidade da resposta inflamatória é a enzima COX-2, que atua apenas em condições nas quais há alguma agressão tecidual. A COX-2 é produzida mediante ativação de sinalização inflamatória, como aquelas mediadas pelos receptores do tipo *Toll* (TLR), pelo receptor do fator de necrose tumoral-alfa (TNFR), pelo receptor de interleucina 1-beta (IL-1R), entre outros.[19]

Dependendo da intensidade da resposta inflamatória mediada por tais receptores, um ponto em comum entre essas vias é a ativação da COX-2. Sua função é idêntica à da COX-1; no entanto, sua potência é muito maior. A justificativa para esse aumento de potência é a alta efetividade que essa molécula apresenta em converter o AA em prostaglandinas, o que intensifica a atividade das funções descritas anteriormente. Por exemplo, em relação à PGE2, constata-se aumento da capacidade de promover vasodilatação, enquanto há maior agregação plaquetária induzida pelo TXA2. Tais características são absolutamente plausíveis, pois, caso tenha ocorrido laceração tecidual, com consequente entrada de micro-organismos, os TXA2 induzem a agregação plaquetária para estancamento hemorrágico, assim como as PGE2 induzem maior vasodilatação para que células do sistema imune cheguem rapidamente ao local, neutralizando os micro-organismos invasores. Contudo, a ativação desse sistema pode, por vezes, causar edema e dor na região afetada. Nesse ínterim, qualquer substância que aliviasse tal condição, sem perder a eficácia da resposta orgânica, teria impacto positivo na resolução da inflamação.[13]

O ácido salicílico teve seu mecanismo de ação descrito a partir da década de 1940 e, até os dias atuais, estudos sobre esse fármaco e sua ação na produção de prostaglandinas têm propiciado o conhecimento de novas ações na resposta inflamatória. Ele é capaz de bloquear a ação da COX-2, atenuando as características da inflamação; no entanto, não é um fármaco específico, uma vez que bloqueia também a ação da COX-1. Cabe ressaltar que os efeitos colaterais observados na terapêutica com o ácido salicílico ou derivados salicílicos são oriundos dessa condição. Com o avanço das ciências farmacêuticas e para atenuar principalmente a condição de dores epigástricas por inflamação no assoalho gástrico (gastrite), a qual, por vezes, evolui com perfurações (úlceras), a indústria acrescentou a molécula de acetil em sua estrutura química, formando então o AAS, um dos anti-inflamatórios mais antigos, comuns e estudados no mundo. Tal ação atenuou os efeitos gástricos negativos, mas não os eliminou.[20]

A partir das observações sobre os processos mecanísticos da inflamação, estas foram associadas à redução da inflamação mediada pelos ácidos graxos ômega 3. Caso o indivíduo tenha ingestão adequada de ômega 3, a constituição das membranas celulares repercutirá tal característica, sendo composta também por EPA e DHA. O EPA, quando liberado para o interior celular, poderá também servir de substrato para a enzima COX-2, a qual poderá convertê-lo em prostaglandinas, mas como referido ante-

riormente, de série ímpar. Além disso, por mais que a capacidade da COX-2 em gerar substratos seja alta, os derivados do EPA apresentam ações atenuadas ou antagônicas em comparação àqueles oriundos do AA, reduzindo de forma significativa a intensidade do processo inflamatório.[21]

Em meados da década de 1980, a observação da modulação do processo inflamatório pelos ácidos graxos ômega 3 firmou-se como sendo o principal mecanismo anti-inflamatório exercido por essas substâncias. Contudo, já no início da década de 2000, outros alvos moleculares para o ômega 3, em pontos na cascata bioquímica anteriores à COX-2, foram observados. Em 2003, destacou-se o fator nuclear kappa B (NF-κB)[22] e, em 2004, a quinase do inibidor do kappa B (IKK).[23] Contudo, apenas em 2010 surgiu, de forma robusta, a descrição mecanística anti-inflamatória exercida pelos ácidos graxos ômega 3, conforme será descrito posteriormente. Postulou-se até mesmo possível atividade anti-inflamatória do ômega 3 em razão dessa molécula impedir a conexão entre o lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano ou ácidos graxos saturados aos receptores de sistema imune TLR2 e TLR4 (Figura 10.2). Apesar de muitos avanços terem sido obtidos nessa área, tal hipótese, mesmo desacreditada, ainda não foi descartada. No entanto, a modulação da produção de prostaglandinas continua sendo fenômeno importante a ser considerado no tônus da resposta inflamatória, pois, apesar de os ácidos graxos ômega 6 serem essenciais à vida, sabe-se que há um limite para o seu consumo saudável e, após a superação desse limite, uma das principais repercussões observadas é sua participação na intensificação da resposta inflamatória.[4,24]

Por exemplo, quando um pequeno ferimento ocorre na pele, o processo inflamatório pode ser intenso caso o indivíduo apresente consumo elevado de ômega 6 em relação ao ômega 3. Há muita discussão na literatura sobre a proporção ideal entre esses ácidos graxos, normalmente recomendando-se três partes de ômega 6 para uma parte de ômega 3 (3:1), até 5:1. Nesse contexto, a partir de uma proporção de 7:1 de ômega 6 em relação ao ômega 3, já pode ocorrer modulação positiva da resposta inflamatória.[25]

ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS E EXPRESSÃO GÊNICA

Receptores acoplados à proteína G

Até meados dos anos 2000, ainda se especulava muito sobre os possíveis mecanismos de ação exercidos pelos diversos ácidos graxos, principalmente o ômega 3, em relação aos seus efeitos benéficos. Acreditava-se, em geral, que os ácidos graxos eram capazes de se incorporar às membranas lipídicas, tornando-se parte delas ou simplesmente acessando o interior celular pela difusão na membrana. Posteriormente, postulou-se a hipótese de receptores de membrana para ácidos graxos, como as proteínas ligadoras de ácidos graxos (FABP, *fatty acid binding protein*). Pouco mais tarde foi evidenciada também a presença dessas FABP no interior celular, conduzindo os ácidos graxos às organelas.[26]

Inicialmente, os receptores acoplados à proteína G (GPCR, *G protein-coupled receptor*) foram denominados receptores órfãos, pois seus ligantes não eram conhecidos. Posteriormente, alguns desses receptores foram descritos como reconhecedores de ácidos graxos, surgindo a hipótese de serem esses os receptores responsáveis pela captação de ácidos graxos e pelo transporte do meio extra para o intracelular. Mesmo após sua descoberta, a função desses receptores ainda permanecia desconhecida, principalmente em razão do fato de que apresentavam homologia de reconhecimento para diversas outras substâncias, como hormônios, neurotransmissores, pequenos peptídeos e esteroides.[27]

Com o avanço dos estudos em biologia molecular, a afinidade dos ácidos graxos por seus respectivos receptores foi sendo descrita. Tornaram-se conhecidos os receptores para ácidos graxos saturados de cadeias curta (GPR41 e 43), média (GPR84) e longa (GPR40 e 120) (Figura 10.3). Outro fato importante foi a determinação da expressão desses receptores em diferentes tecidos, pois assim como ocorre com outras proteínas, um mesmo receptor apresenta diferentes níveis de expressão, dependendo do tecido avaliado.[28]

Em 2010, um importante trabalho descobriu a função para o receptor GPR120. Inicialmente, descreveram-se os ácidos graxos capazes de se ligar ao GPR120, os quais, de acordo com o grau de afinidade, são: DHA (ômega 3), EPA (ômega 3), palmitoleico (ômega 7) e oleico (ômega 9). Ácidos graxos ômega 6 aparentemente não possuem nenhuma afinidade por esse receptor. Sendo assim, seria possível especular que suas ações iniciais são independentes das proporções consumidas entre ômega 3 e ômega 6. Ainda, o GPR120 parece ser capaz de incorporar ácidos graxos ao meio intracelular, sendo essa uma nova proposta para a captação intracelular de ácidos graxos.[28]

Ainda que essas grandes descobertas tenham auxiliado na compreensão de diversas controvérsias entre a captação intracelular e a função dos ácidos graxos, há muito a ser descrito sobre sua sinalização intracelular. Por exemplo, o GPR40 apresenta alta afinidade pelo ácido graxo oleico, porém ácidos graxos ômega 3 também apresentam relativa capacidade de conexão e ativação desse receptor,

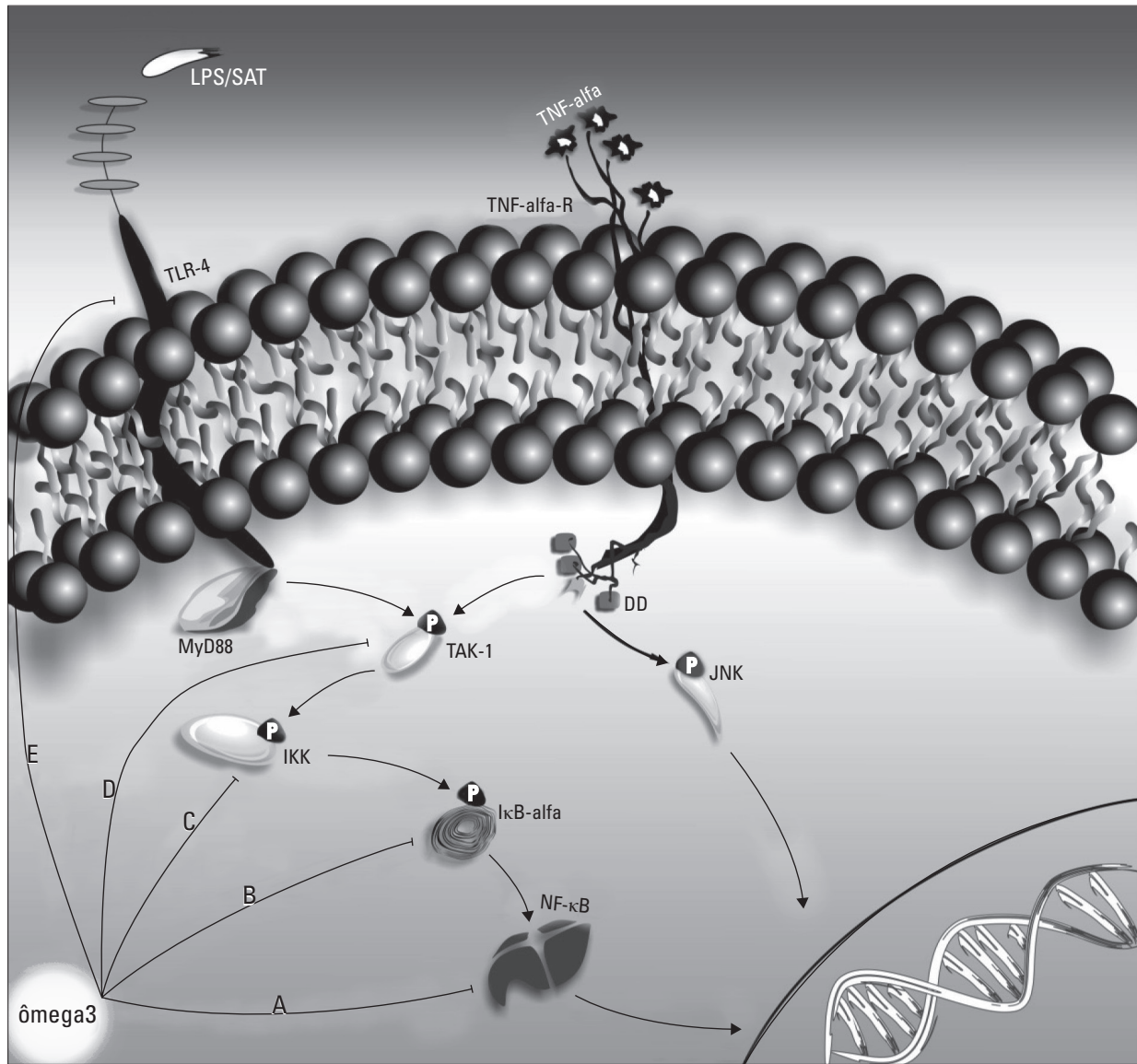



Figura 10.2 Hipóteses da mecanística anti-inflamatória dos ácidos graxos ômega 3. A-B: A concepção na modulação das ciclo-oxigenases como mecanismo anti-inflamatório dos ácidos graxos ômega 3 durou de 1979 a meados de 2003, quando Ross et al.[29] apontaram o fator nuclear kappa B (NF-κB) como alvo. C: Ainda em 2003, Whitehouse e Tisdale[30] mostraram a inibição do inibidor de kappa B (IκB) pelo ômega 3, independentemente da desativação de receptores do tipo *Toll* (TLR). D: Em 2010, o grupo liderado por Jerrold Olefsky[28] demonstrou a inibição da proteína quinase 1 ativada pelo fator de transformação de crescimento beta (TAK-1) pelos ácidos graxos ômega 3. E: Em 2008, Gabler et al.[31] mostraram também a possibilidade de os ácidos graxos ômega 3 reduzirem a participação dos TLR na transdução do sinal inflamatório. DD: domínio de morte do receptor do TNF; IKK: quinase do inibidor de kappa B; IκB-alfa: inibidor de kappa B alfa; JNK: c-jun quinase amino terminal; LPS/SAT: lipopolissacarídeo/ácidos graxos saturados; MyD88: fator de diferenciação mieloide 88; TLR-4: receptor do tipo *Toll* 4; TNF-alfa: fator de necrose tumoral alfa; TNF-alfa-R: receptor do fator de necrose tumoral alfa; ômega3: ácido graxo ômega 3.

bem como os ácidos graxos ômega 6, ainda que em menor grau. As respostas induzidas serão diferentes de acordo com o sítio de ligação de cada ácido graxo ao receptor. Nesse sentido, é importante destacar que devem ser consideradas as características genéticas de cada indivíduo, uma vez que polimorfismos de nucleotídeo único já foram descritos nos genes desses receptores e podem resultar em alteração de suas funções.[32]

Com o intuito de descrever a função do receptor GPR120, pesquisadores demonstraram em células de tecido adiposo que ácidos graxos ômega 3 se ligam ao GPR120. Depois da ligação, o próprio receptor dispara sinais intracelulares que alteram o comportamento celular, antes mesmo de o ácido graxo ser incorporado pela célula. A proteína beta arrestina parece ser a primeira a ser ativada pelo receptor. Sua função é a de sequestrar e arrastar outras proteínas no interior celular. Quando o ômega 3 se liga ao GPR120, a beta arrestina se move até esse receptor, acoplando-se e arrastando-o para o interior da célula, juntamente com o ácido graxo que estava do lado de fora.[28]

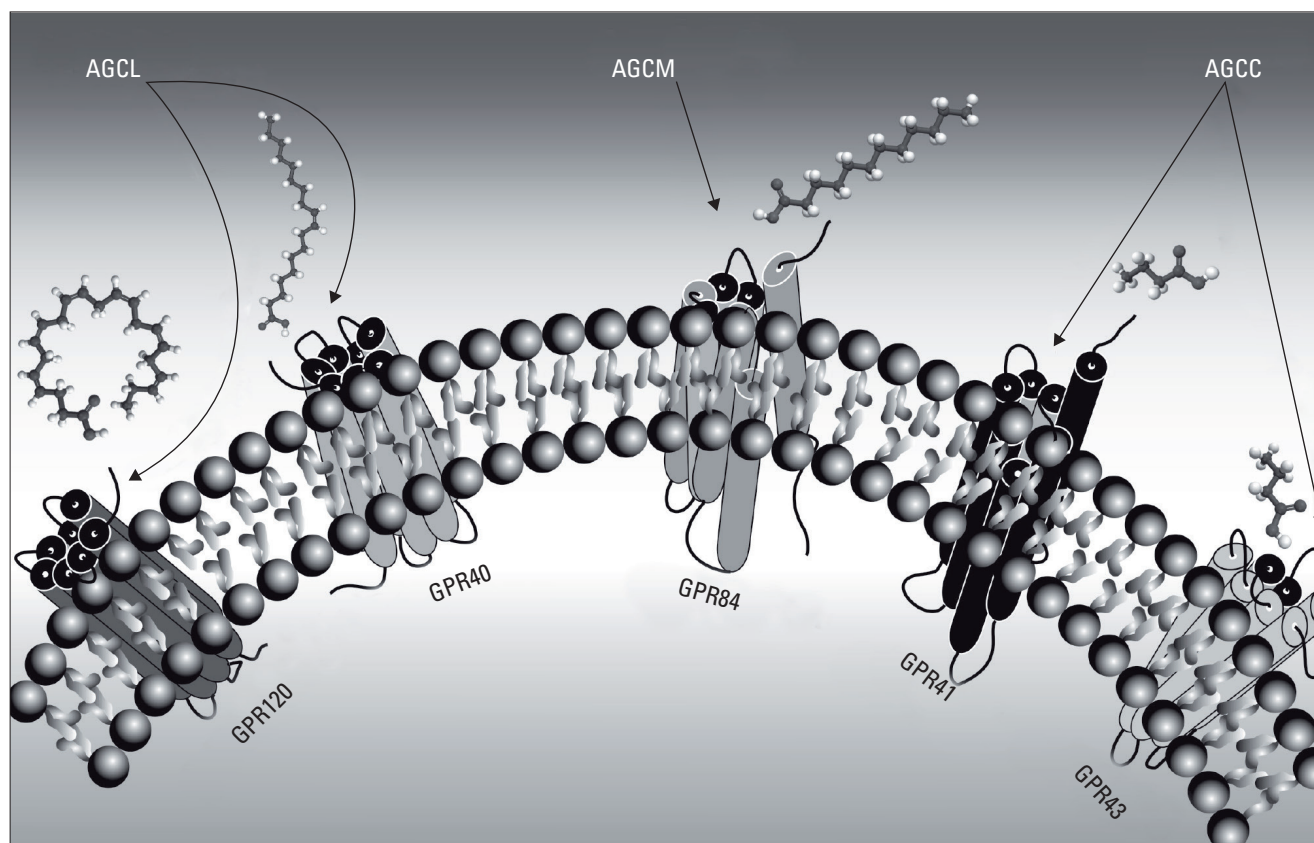



Figura 10.3 Receptores de ácidos graxos. GPR120: receptor principal dos ácidos graxos docosa-hexaenoico (DHA), eicosapentaenoico (EPA) e alfa-linolênico (ALA); reconhece também o ácido graxo oleico, mas com baixa intensidade. GPR40: reconhecedor principal dos ácidos graxos monoinsaturados oleico e palmitoleico. GPR84: reconhecedor principal de ácidos graxos de cadeia média. GPR41 e 43: reconhecedores principais dos ácidos graxos de cadeia curta. AGCL: ácido graxo de cadeia longa; AGCM: ácido graxo de cadeia média; AGCC: ácido graxo de cadeia curta.

Sabe-se há algumas décadas que o ômega 3 é um potente agente anti-inflamatório. Durante esse tempo, sua ação anti-inflamatória foi atribuída à sua capacidade de modular a síntese de eicosanoides. Posteriormente, descreveu-se que a alta concentração de prostaglandinas oriundas do processo inflamatório está relacionada à ativação do fator de transcrição NF-kB, por meio da indução da expressão gênica da COX2. Neste momento, postulou-se que talvez os ácidos graxos ômega 3 reduziriam o processo inflamatório por inibirem a via de sinalização do NF-kB (ver Figura 10.2). No trabalho de Oh et al.,[28] demonstrou-se também que, quando há processo inflamatório deflagrado, o ômega 3 se liga ao GPR120 e induz a mesma sinalização descrita anteriormente, atraindo para si a proteína beta arrestina. Contudo, o deslocamento da beta arrestina em direção ao GPR120 arrasta consigo proteínas chamadas de TAB (TAB1, 2 e 3), as quais são fundamentais na ativação do processo inflamatório desencadeado pelos TLR e de citocinas, como TNF-alfa, IL-1beta e IL-6. Como as sinalizações ocorrem em cascata, a beta arrestina, ao ser atraída para o GPR120, sequestra a Tab-1/2 e desarticula a transdução inflamatória, impedindo que o NF-kB seja ativado e que a inflamação seja efetivamente deflagrada (Figura 10.4).[33]

Os fatores 6 e 2 associados ao receptor do fator de necrose tumoral citoplasmático (TRAF-6 e TRAF-2), relacionados às vias de sinalização dos receptores TLR4 e TNF-alfa, respectivamente, apresentam em comum a capacidade de ativar a proteína TAK-1.[34] Para que a TAK-1 seja fosforilada e ativada, ela precisa das proteínas TAB-1/2. Desta forma, quando os receptores TLR4 ou de citocinas são ativados, as proteínas TAB são recrutadas do citoplasma e se ligam à TAK-1. Nesse momento, as TAB ajudam a expor um sítio de ligação na TAK-1 para ubiquitinas. A TAK-1 é então ubiquitinada e esse processo induz sua fosforilação. Uma vez fosforilada, a TAK-1 é capaz de transduzir seu sinal para a IKK, que dá continuidade à via clássica inflamatória mediada pelo NF-kB (Figura 10.4). Portanto, a proteína TAK-1 tem atividade central nas vias inflamatórias, sendo alvo importante para estratégias anti-inflamatórias. A capacidade anti-inflamatória dos ácidos graxos ômega 3 está justamente relacionada à desarticulação do complexo TAK-1-TAB-1/2-ubiquitina.[35,36]

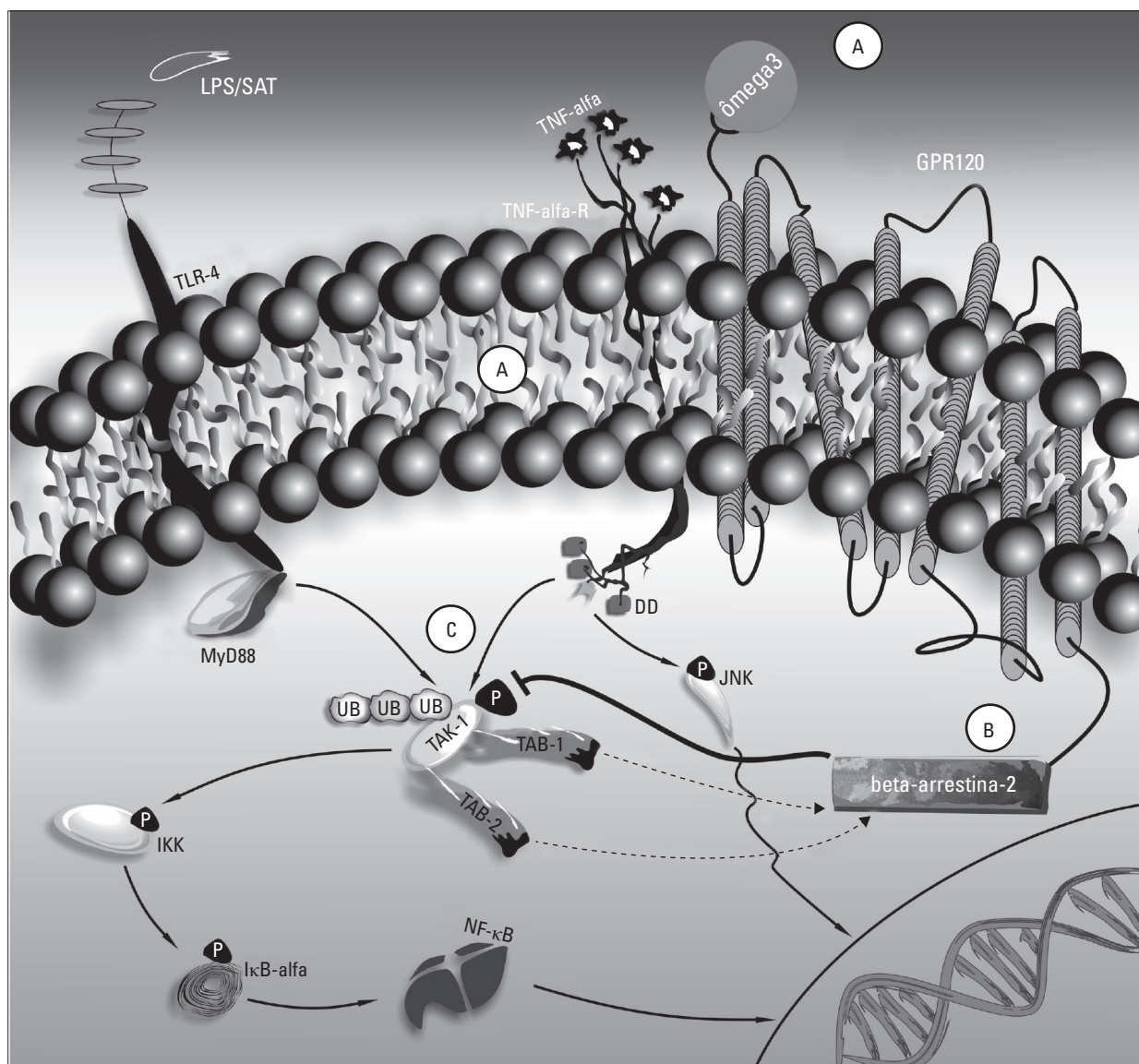



Figura 10.4 Mecanismo anti-inflamatório de ácidos graxos ômega 3. A: Os ácidos graxos docosa-hexaenoico (DHA), eicosapentaenoico (EPA) ou alfa-linolênico (ALA) se ligam ao receptor GPR120, recrutando a proteína beta arrestina para sua base. B: A proteína beta arrestina, quando ativada pelo GPR120, resgata as proteínas TAB-1/2 do complexo proteico inflamatório disparado pelos receptores das citocinas ou da via do TLR. C: O complexo TAK-1-TAB-1/2-ubiquitina é desarticulado pela beta arrestina; consequentemente, a IKK é desfosforilada, rompendo com o círculo vicioso inflamatório. DD: domínio de morte do receptor do TNF; IκB-alfa: inibidor de κB-alfa; IKK: quinase do inibidor de kappa B; JNK: quinase c-Jun amino terminal; LPS: lipopolissacarídeo; SAT: gordura saturada; GPR120: receptor 120 acoplado à proteína G; MyD88: fator de diferenciação mieloide 88; NF-κB: fator nuclear kappa B; TAB-1/2: proteína 1/2 de ligação a TAK-1; TAK-1: proteína quinase 1 ativada por fator de crescimento transformador beta; TLR: receptor do tipo *Toll*; TNF-alfa: fator de necrose tumoral alfa; TNF-alfa-R: receptor do fator de necrose tumoral alfa; UB: ubiquitina.

Diversos são os tecidos que expressam o GPR120 de forma constitutiva. Dentre os principais, com funções parcialmente descritas, estão o pâncreas e a língua. Agonistas do GPR120 têm sido utilizados na tentativa de aumentar a secreção de insulina. É certo que a ação direta no GPR120 no pâncreas possa ter algum efeito; no entanto, caso a substância seja ministrada por via oral, o intestino parece ter papel importante nessa ação, uma vez que tal receptor pode aumentar a secreção de peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) na corrente sanguínea, hormônio que intensifica a secreção pancreática de insulina. Após o ácido graxo ser absorvido do intestino para a corrente sanguínea, ainda pode se ligar em seus receptores pancreáticos, intensificando ainda mais a liberação de insulina. Contudo, o GPR120 não executa sozinho esse mecanismo, uma vez que seu receptor homólogo, o GPR40, também parece desempenhar a mesma função, sem mecanismo claramente descrito. Já na língua, mais especificamente nas papilas valadas, os ácidos graxos ômega 3 se ligam ao GPR120 e parecem ativar respostas neurológicas

de maneira direta. Ainda não se tem conhecimento sobre sua função ou mesmo mecanismo; contudo, especula-se que relaciona-se ao papel regulatório da fome.[37]

O mecanismo pelo qual ácidos graxos ômega 6 desempenham suas funções por meio de receptores do tipo GPCR ainda permanece obscuro, necessitando ser mais investigado. Contudo, as antigas discussões sobre as proporções de ingestão entre ômega 6 e ômega 3 se mantêm válidas. Nesse sentido, o avanço de estudos de nutrigenômica poderá demonstrar todas as potencialidades, essencialidades e particularidades desses ácidos graxos na transdução de sinais, tanto em humanos quanto em animais.

Proteína de ligação ao elemento regulatório de esterol

A proteína de ligação ao elemento regulatório de esterol (SREBP) é o principal fator de transcrição responsável por regular a expressão de genes hepáticos envolvidos no metabolismo de ácidos graxos (*SREBF1*) e na síntese de colesterol (*SREBF2*). O SREBP é sintetizado como proteína precursora inativa e encontra-se no retículo endoplasmático associado à proteína ativadora da clivagem de SREBP (SCAP), sendo o complexo ancorado pela proteína Insig (*insulin-induced gene 1 protein*). Em condições de baixas concentrações de esteróis, o complexo SREBP/SCAP dissocia-se da Insig, translocando-se para o complexo de Golgi via transportador vesicular. No complexo de Golgi, o SREBP se dissocia da SCAP, o que desencadeia clivagens proteolíticas, liberando o fragmento ativo do SREBP, que é responsável por ligar-se ao elemento de resposta na região promotora dos genes alvos.[38]

O SREBP não é regulado apenas por esteróis, mas também pode ser modulado por ácidos graxos poli-insaturados. Estudos mostram que os ácidos graxos poli-insaturados são capazes de inibir a transcrição de genes lipogênicos por meio da redução da atividade do fator de transcrição SREBP-1c. Embora os mecanismos não tenham sido totalmente esclarecidos, sugere-se que os ácidos graxos poli-insaturados modulem a expressão do SREBP por inibir a clivagem proteolítica e a liberação do SREBP no retículo endoplasmático, bem como por suprimir a expressão gênica de *SREBF1*.[39,40]

Um possível alvo dos ácidos graxos poli-insaturados é a proteína ligada à membrana do retículo endoplasmático Ubxd8, responsável por facilitar a degradação da Insig-1, induzindo a ativação do SREBP. Nesse sentido, os ácidos graxos poli-insaturados parecem reduzir a atividade da Ubxd8, mantendo o complexo SREBP/SCAP no retículo endoplasmático, inibindo assim a ativação do SREBP.[41] Além disso, os ácidos graxos poli-insaturados podem diminuir a expressão de RNAm do SREBP por antagonizar a atividade do receptor X hepático alfa (LXR-alfa), que é essencial para a transcrição do SREBP-1.[42,43]

Estudos *in vivo* também demonstram efeito hipocolesterolêmico dos ácidos graxos poli-insaturados, em especial daqueles derivados de óleo de peixe.[44,45] Em camundongos adultos, o consumo de uma dieta hiperlipídica (60% do valor energético) rica em óleo de peixe (7% EPA; 24% DHA), por cinco meses, foi capaz de reduzir a concentração hepática de triacilgliceróis e de colesterol em comparação à dieta hiperlipídica rica em ômega 6 proveniente do óleo de cártamo. Tal efeito hipolipidêmico foi associado à redução da expressão de SREBP1 e SREBP2, tanto na sua forma precursora quanto madura, resultando, consequentemente, em menor expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico, como o que codifica o receptor de LDL (*Ldlr*) e aqueles que codificam as enzimas 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (Hmgcr) e ácido graxo sintase (Fas).[46]

Receptores ativados por proliferadores de peroxissomos

Os receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPAR) pertencem à superfamília dos receptores nucleares induzidos por ligantes. Até o momento, três isotipos de PPAR foram identificados: PPAR-alfa, expresso predominantemente no fígado; PPAR-gama, expresso no tecido adiposo e nas células do sistema imune; e PPAR-beta/delta, expresso ubiquamente.[47,48] Dependendo do local em que são expressos, esses receptores desempenham funções biológicas específicas (Tabela 10.1).

Ácidos graxos poli-insaturados são ligantes naturais dos PPAR[49] e contêm três elementos essenciais para tal ligação: grupo carboxílico, cadeia longa e região terminal hidrofóbica. Outros metabólitos derivados de ácidos graxos, como ácidos graxos oxidados e eicosanoides, também são ligantes dos PPAR. Após a ligação do ácido graxo ou do seu metabólito no sítio de ligação do PPAR, ocorre mudança conformacional do receptor, resultando na formação de um heterodímero com o receptor de retinoide X (RXR). O heterodímero PPAR-RXR então se liga ao elemento de resposta ao proliferador de peroxissomo (PPRE) na região promotora do respectivo gene alvo, permitindo o recrutamento de coativadores e o desligamento de correpressores, o que resulta na ativação da transcrição gênica.[50]

Os PPAR também podem reprimir a expressão de certos genes por interferirem negativamente com outros fatores de transcrição, mecanismo denominado transrepressão. Dentre os fatores de transcrição transreprimidos pelos PPAR estão o NF-kB, a proteína ativadora (AP-1) e

a proteína estimuladora de ligação de CCAAT (C/EBP). Essa transrepressão envolve interações físicas com outros fatores de transcrição, bem como regulação da atividade de proteínas quinases e competição entre cofatores.[51]

O PPAR-alfa apresenta importante papel no catabolismo lipídico, regulando indiretamente o metabolismo da glicose e a sensibilidade à insulina.[52] Estudos com animais *knockout* para o gene que codifica o PPAR-alfa confirmam seu papel no controle na expressão de diversos genes envolvidos no metabolismo lipídico hepático (*Apoa1*, *Apoa2* e *Apoa5*), na oxidação de ácidos graxos (*Acox1*, *Cpta1* e *Cpt2*), no processo de dessaturação (*Fads6*), no metabolismo do HDL (*Pltp*) e na síntese de corpos cetônicos (*Hmgcs2*).[53] Estudos mostram que ácidos graxos ômega 3 apresentam maior efetividade na ativação do PPAR-alfa do que os ácidos graxos ômega 6. Essa ativação provoca a transcrição de genes envolvidos na betaoxidação lipídica, além de estar relacionada com o aumento do gasto energético e a menor síntese de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL).[54] Em contrapartida, a ativação deficiente do PPAR-alfa resulta na redução na oxidação de ácidos graxos e favorece o desenvolvimento da esteatose hepática.[55]

Estudos demonstraram também efeito anti-inflamatório dos ácidos graxos poli-insaturados mediado por PPAR-alfa, os quais interagem com as proteínas p65 e c-Jun, reprimindo a expressão de genes pró-inflamatórios das vias do NF-kB e da AP-1.[51,55] Corroborando com esse dado, estudos com roedores mostraram efeito anti-inflamatório da suplementação com óleo de peixe, rico em EPA e DHA. Tal efeito foi mediado via ativação do PPAR-alfa e repressão do NF-kB no fígado, sugerindo ação antagonista do PPAR na transcrição do NF-kB.[56,57]

Embora os estudos sejam controversos, sugere-se que o PPAR-beta/delta esteja envolvido na regulação da adipogênese e da diferenciação de adipócitos, bem como no metabolismo de lipídios e no gasto energético. Em modelos animais, o PPAR-beta serve como regulador da ingestão lipídica. Camundongos PPAR-beta$^{-/-}$ mostraram maior suscetibilidade à obesidade após dieta hiperlipídica.[55] Os ácidos graxos poli-insaturados da alimentação, especialmente o ômega 3, ativam o PPAR-beta/delta, aumentando a expressão da proteína desacopladora 3 (UCP3) no músculo esquelético, da proteína desacopladora 2 (UCP2) no tecido adiposo branco e da proteína desacopladora 1 (UCP1) no tecido adiposo marrom, o que sugere atuação desses ácidos graxos na dissipação de energia. A ativação do PPAR-beta/delta pelos ácidos graxos poli-insaturados em adipócitos maduros provoca redução da massa adiposa por induzir a expressão de genes envolvidos na betaoxidação lipídica.[54]

O PPAR-gama apresenta importante papel no tecido adiposo por atuar na regulação do processo da adipogênese, protegendo outros tecidos da toxicidade lipídica.

Tabela 10.1 Receptores ativados por proliferadores de peroxissomos alfa, gama e beta/delta: principais locais de expressão, funções biológicas, ligantes naturais e classes de drogas utilizadas na clínica

	PPAR-alfa	PPAR-gama	PPAR-beta/delta
Tecidos em que são expressos	Fígado Coração Rins Adrenais	Tecido adiposo Baço Adrenais Cólon	Diversos tecidos
Células específicas em que são expressos	Células endoteliais Macrófagos	Macrófagos Células T	Diversos tipos celulares
Funções biológicas	Metabolismo de lipoproteínas Betaoxidação Resposta anti-inflamatória	Diferenciação de adipócitos Homeostase da glicose Resposta anti-inflamatória	Biologia endotelial Utilização de energia Metabolismo lipídico
Ligantes	AGPI 8(S)-HETE	AGPI 15d-PGJ2 13-HETE 9-HODE	AGPI
Disfunções	Hipertrigliceridemia Esteatose hepática	Diabete melito tipo 2	Suscetibilidade à obesidade
Fármacos	Fibratos	Tiazolidinedionas	GW501516

15d-PGJ2: 15-deoxi-delta^{12,14}-prostaglandina; AGPI: ácidos graxos poli-insaturados; HETE: ácido hidroxieicosatetraenoico; HODE: ácido hidroxioctadecadienoico.
Fonte: adaptada de Li e Glass.[58]

Em roedores, a dieta hiperlipídica provoca aumento da massa adiposa, tanto pelo processo de hipertrofia como de hiperplasia, o que está diretamente relacionado com a diferenciação de adipócitos e com o processo de lipogênese, induzidos pelo PPAR-gama. Entretanto, o tipo de ácido graxo consumido produz diferentes respostas. Modelos *in vitro* mostraram que, apesar de os ácidos graxos poli-insaturados serem ligantes do PPAR-gama, são menos efetivos na sua ativação quando comparados aos ácidos graxos saturados e monoinsaturados. Corroborando com estudos *in vitro*, camundongos que consumiram ácidos graxos poli-insaturados derivados de óleo de peixe apresentaram adipócitos com menor volume e com maior sensibilidade à insulina.[54]

Além disso, o PPAR-gama está relacionado com a modulação do metabolismo lipídico e com a homeostase da glicose. Dessa forma, a ativação do PPAR-gama resulta na liberação de ácidos graxos livres das partículas de quilomícrons e VLDL, assim como aumenta a expressão de genes envolvidos com a síntese, a esterificação e o transporte intracelular de ácidos graxos. Uma classe de drogas sensibilizadoras de insulina, as tiazolidinedionas (TZD), é agonista sintética do PPAR-gama. Em roedores, a deleção do gene do PPAR-gama provoca resistência insulínica no tecido adiposo e prejuízos também no músculo esquelético e no fígado. Demonstrou-se que a ativação do PPAR-gama induz a expressão do transportador de glicose 4 (GLUT-4) e da adiponectina, ambos importantes moduladores da ação da insulina.[58]

Outra importante função do PPAR-gama consiste no controle da resposta inflamatória. A ativação desse receptor nuclear por ligante sintético (TZD) reduziu a expressão de diversos mediadores inflamatórios [TNF-alfa, IL-6, IL-1beta, óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e metalopeptidase de matriz 9 (MMP-9)] em cultura de macrófagos (RAW 264.7). Isso pode estar associado com a redução da ativação do NF-kB, da AP-1 e da proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição (STAT).[59] Evidências mostram que os ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 apresentam propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras por diversos mecanismos, sobretudo por aumentar a expressão do PPAR-gama, o qual pode interferir na atividade do fator de transcrição NF-kB.[60]

TLR2 e TLR4 (receptores do tipo *Toll* 2 e 4)

Receptores TLR apresentam papel importante na detecção de infecção microbiana e na indução das respostas imune e inflamatória, ao reconhecer estruturas microbianas conservadas, denominadas padrões moleculares associados a patógenos (PAMP). Entre os membros da família do TLR, o TLR4 apresenta capacidade de resposta ao LPS, o qual está presente na parede de bactérias Gram-negativas, ao passo que o TLR2 reconhece outros componentes da parede celular de bactérias, como as lipoproteínas bacterianas. A sinalização via TLR provoca o recrutamento de moléculas adaptadoras e a ativação de vias de sinalização dos fatores de transcrição, incluindo o NF-kB e o fator regulador de interferon (IRF), os quais são responsáveis pela transcrição de mediadores pró-inflamatórios.[61]

A ativação dos TLR também pode ser modulada por diferentes tipos de ácidos graxos. Embora o efeito modulador dos ácidos graxos na inflamação seja atribuído principalmente aos seus metabólitos (prostaglandinas, leucotrienos, resolvinas, endocanabinoides, ceramidas e diacilgliceróis), evidências mostram que ácidos graxos podem ativar ou inibir diretamente as vias inflamatórias mediadas por TLR. Ácidos graxos saturados, por exemplo, são agonistas do TLR2 e TLR4 e, portanto, ativam a via de sinalização do NF-kB, induzindo a expressão de mediadores inflamatórios, como COX-2, iNOS e IL-1 (Figura 10.5). Por outro lado, ácidos graxos poli-insaturados inibem a ativação do NF-kB induzida por LPS ou por ácidos graxos saturados, bem como a expressão de citocinas pró-inflamatórias em células mononucleares em humanos.[62,63]

Dentre os mecanismos propostos, os ácidos graxos poli-insaturados parecem bloquear a ativação da via de sinalização inflamatória, interferindo diretamente nos receptores TLR2 e TLR4.[64] Em culturas de células, tanto EPA como DHA são capazes de inibir a ativação dos heterodímeros TLR2-TLR1, TLR2-TLR6 e do homodímero TLR4-TLR4 induzidos por seus respectivos agonistas.[62,63,65] Além disso, a suplementação de poli-insaturados também pode alterar a composição lipídica da membrana celular, influenciando fatores como fluidez, permeabilidade e funcionalidade dos receptores transmembrana e, dessa forma, bloquear a sinalização e ativação do NF-kB (Figura 10.5).[66]

HNF-4 alfa (fator nuclear de hepatócitos 4 alfa)

O fator nuclear 4 de hepatócitos alfa (HNF-4alfa) é outro receptor nuclear com sítio de ligação para ácidos graxos. O HNF-4alfa é altamente expresso no fígado e responsável por ativar genes envolvidos na diferenciação e na função de hepatócitos, incluindo a destoxificação (citocromo P450), o metabolismo dos ácidos biliares (*ATP binding cassete B11*), o metabolismo e secreção de lipoproteínas (apolipoproteínas A1, A5, B), o metabolismo de carboidratos (proteína regulatória glicoquinase), a lipogênese (ácido graxo sintase), o ciclo da ureia e o metabolismo de álcool.[67]

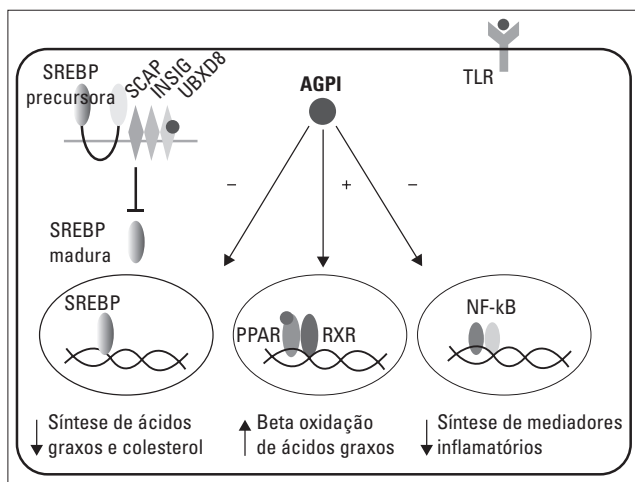



Figura 10.5 Mecanismos regulados por ácidos graxos poli-insaturados. AGPI: ácido graxo poli-insaturado; INSIG: *insulin-induced gene 1 protein*; NF-kB: fator nuclear kappa B; PPAR: receptor ativado por proliferadores de peroxissomos; RXR: receptor X de retinoides; SCAP: proteína ativadora da SREBP; SREBP: proteína de ligação ao elemento regulatório de esteróis; TLR: receptor do tipo *Toll;* UBXD8: proteína semelhante à ubiquitina com domínio UBX. **Fonte:** adaptada de Georgiadi e Kersten.[50]

Alguns estudos sugerem que os ácidos graxos poli--insaturados acil-CoA tioéster interferem na atividade do HNF-4alfa, reprimindo a transcrição de genes envolvidos no metabolismo da glicose. Em cultura de células hepáticas, ácidos graxos poli-insaturados acil-CoA demonstraram efeito repressor na atividade do HNF-4alfa, reduzindo a expressão de glicose-6-fosfatase.[68] Contudo, existem controvérsias na literatura a respeito do papel dos ácidos graxos poli-insaturados na regulação do HNF-4alfa. Alguns estudos revelam que o ácido graxo possui papel estrutural na conformação da proteína, não afetando a ativação do HNF-4alfa.[50]

Fator de transcrição nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2

O fator de transcrição nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) é o principal regulador da resposta oxidativa. Em condições basais, o Nrf2 permanece sequestrado no citoplasma pela proteína KEAP1 (*kelch-like ECH-associated protein 1*). Essa ligação promove ubiquitinação e subsequente degradação proteassômica do Nrf2, mantendo concentrações intracelulares relativamente baixas. No entanto, em resposta ao estresse oxidativo, ocorre modificação nos resíduos de cisteína da KEAP1, resultando na liberação do Nrf2 e translocação ao núcleo. No núcleo, o Nrf2 forma heterodímero com outros fatores de transcrição, como sMaf, JunD, ATF4, o que permite a ligação no elemento de resposta da região promotora de genes alvos ligados à defesa antioxidante, incluindo enzimas relacionadas com a destoxificação, como a NADPH quinona oxirredutase (NQO1) e a heme oxigenase 1 (HO-1), bem como enzimas antioxidantes como a gama-glutamato cisteína ligase (GCLM).[69]

Evidências científicas mostram que ácidos graxos poli-insaturados derivados de óleo de peixe apresentam efeito antioxidante e ateroprotetor. Todavia, em estágio inicial, o ácido graxo poli-insaturado provoca a geração de espécies reativas de oxigênio, o que é logo regulado pelo aumento da expressão de heme oxigenase 1 (HO-1) induzido pela ativação do fator de transcrição Nrf2.[70] Demonstrou-se que são os produtos de oxidação de ácidos graxos (ácido graxo linoleico, EPA e DHA), e não os ácidos graxos intactos, que reagem com a proteína KEAP1, inibindo a ubiquitinação e favorecendo a expressão de genes envolvidos na resposta oxidativa.[50] Nesse sentido, observou-se que a administração de óleo de peixe, rico em EPA e DHA, aumentou a concentração de 4 hidroxi hexenal (4-HHE), um produto de peroxidação dos ácidos graxos poli-insaturados ômega 3. O aumento de 4-HHE, por sua vez, induziu a ativação do fator de transcrição Nrf2, bem como o aumento da expressão de HO-1 em culturas de células neuronais e endoteliais de camundongos.[71,72] O mesmo efeito também foi observado em células endoteliais humanas, sugerindo que a peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados oriundos da dieta induz a ativação da via do Nrf2, resultando em efeito protetor contra o estresse oxidativo (Figura 10.6).[73]

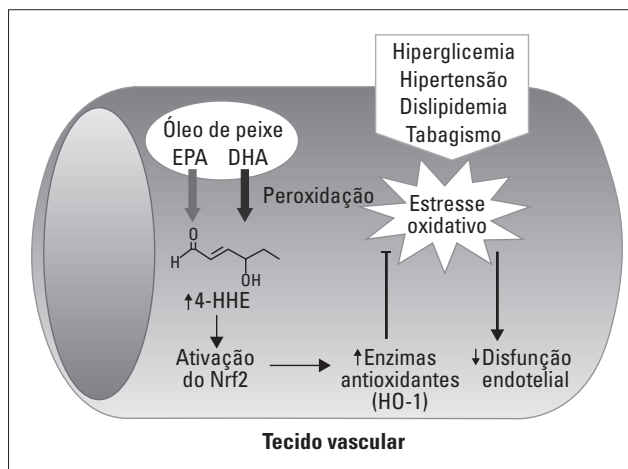



Figura 10.6 Efeito antioxidante dos ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 via ativação do Nrf2. 4-HHE: 4 hidroxi hexenal; DHA: ácido docosa-hexaenoico; EPA: ácido eicosapentaenoico; HO-1: heme oxigenase 1; Nrf2: fator de transcrição nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2. **Fonte:** adaptada de fator Ishikado et al.[71]

ESTUDOS DE TRANSCRIPTÔMICA EM HUMANOS ENVOLVENDO INTERVENÇÕES COM ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS

Evidências científicas mostram que os ácidos graxos poli-insaturados podem modular a expressão de genes

por meio da regulação de diferentes vias de sinalização.[74,75] Para compreender os mecanismos moleculares pelos quais ácidos graxos podem alterar a expressão gênica e regular diferentes processos biológicos, são importantes estudos com ampla abordagem genômica, como a transcriptômica. A seguir, serão apresentados resultados de estudos de intervenção aguda (pós-prandial) e crônica envolvendo ácidos graxos poli-insaturados, utilizando a tecnologia transcriptômica. Serão considerados apenas estudos em células mononucleares do sangue periférico – basicamente monócitos e linfócitos – visto que constituem biomarcadores transcriptômicos acessíveis aos estudos em humanos. Além disso, pelo fato dessas células circularem pelo organismo, expondo-se a diversos tecidos metabólicos, elas podem refletir determinadas condições fisiopatológicas, como a inflamação crônica de baixa intensidade presente no tecido adiposo branco.[76]

Pós-prandial

Diante da grande disponibilidade de alimentos, um indivíduo permanece a maior parte do dia no período pós-prandial, portanto, estudos que avaliem o efeito agudo de uma refeição são de extrema importância. Após o consumo de uma refeição hiperlipídica, ocorrem alterações no metabolismo lipídico pós-prandial, como o aumento dos triacilgliceróis circulantes.[77] A magnitude da hipertrigliceridemia está relacionada com o aumento da resposta inflamatória e com o prejuízo da função endotelial, o que representa risco cardiovascular.[77-79] Além disso, estudos sugerem que a hipertrigliceridemia pós-prandial também afeta a secreção e a ação da insulina, contribuindo para o desenvolvimento da resistência a esse hormônio.[80] Contudo, a qualidade dos ácidos graxos parece produzir diferentes efeitos pós-prandiais, como demonstrado em estudo no qual os ácidos graxos saturados apresentaram maior potencial pró-oxidativo comparado aos ácidos graxos monoinsaturados e aos poli-insaturados ômega 3.[81]

Ainda são poucos os estudos de transcriptômica realizados para avaliar as respostas pós-prandiais em relação ao consumo de diferentes ácidos graxos. Apenas um estudo *crossover* randomizado avaliou o perfil pós-prandial de expressão gênica mediante a ingestão de diferentes ácidos graxos. O estudo realizou ensaio de *microarray* com amostras de células mononucleares do sangue periférico de homens saudáveis, no período de seis horas após a ingestão de bebida à base de manteiga rica em ácidos graxos saturados *versus* bebida rica em DHA. O ensaio mostrou que as alterações na expressão de genes ocorriam de maneira específica para cada tipo de ácido graxo.[82]

Entre os resultados, o estudo mostrou que os ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 regularam a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico de forma contrária aos ácidos graxos saturados. Verificou-se que a ingestão da bebida rica em ácidos graxos poli-insaturados regulou negativamente a expressão dos genes *SREBF1*, *ABCA1* e *ABCG1*, os quais são regulados pelo fator de transcrição nuclear LXR.[82] O SREBP1 é o principal fator de transcrição envolvido na síntese de ácidos graxos e no metabolismo de colesterol, enquanto ABCA1 e ABCG1 apresentam papel na modulação do transporte reverso de colesterol em macrófagos.[83,84] Apesar de contraditórios, estudos *in vitro* também demonstram que ácidos graxos poli-insaturados reduzem a expressão dos genes *ABCA1* e *ABCG1*.[85,86] Os efeitos observados em células mononucleares são provavelmente temporários e específicos durante a resposta pós-prandial, quando as concentrações de lipídios no sangue estão elevadas.[82]

Outro processo regulado por ácidos graxos poli-insaturados está relacionado com a resposta ao estresse celular, mediada pelo fator de transcrição Nrf2. O consumo de ácidos graxos poli-insaturados reduziu a expressão de genes envolvidos com o metabolismo da glutationa, como aquele que codifica a glutationa *S*-transferase, bem como aumentou a expressão de genes relacionados com a inflamação e o estresse celular. Entre os genes relacionados com a inflamação, houve aumento da expressão de *JUN*, o qual codifica um componente da via do fator de transcrição AP-1, e é ativado por estímulos de estresse celular.[82] Apesar de os resultados serem contrários ao efeito crônico, os autores sugerem que, no período pós-prandial, os ácidos graxos poli-insaturados induzem estresse celular nas células mononucleares, mas que, em longo prazo, produzem efeito anti-inflamatório por ativar mecanismos adaptativos de proteção ao estresse.[74,82]

Crônicos

A exposição diária aos ácidos graxos por meio da alimentação pode provocar, em longo prazo, importantes alterações metabólicas, como mudança no padrão de incorporação de ácidos graxos na membrana celular e adaptações das vias moleculares nos tecidos metabólicos, como tecido adiposo, hepático, cardíaco e musculoesquelético.[74]

Diversos estudos avaliaram os efeitos crônicos da suplementação de ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 em humanos, porém poucos apresentavam abordagem transcriptômica (Tabela 10.2). Um dos estudos avaliou o efeito da suplementação diária de 3 g de óleo de peixe (1,9 g de EPA e 1,1 g de DHA) por seis semanas em indivíduos normolipidêmicos. Alterações na expressão gênica foram avaliadas em células mononucleares pelo ensaio de *mi-*

croarray. A suplementação crônica de óleo de peixe alterou a expressão de genes regulados pela via do fator de transcrição nuclear PPAR-alfa.[87] Os ácidos graxos poli-insaturados são ligantes do PPAR-alfa, envolvido particularmente no metabolismo das lipoproteínas e na oxidação de ácidos graxos.[88] A redução da concentração de triacilgliceróis observada após o consumo de óleo de peixe pode estar relacionada com maior expressão da lipase de lipoproteínas e com a inibição da apolipoproteína C-III, ambas induzidas por PPAR-alfa. Além disso, o consumo de ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 mostrou efeito anti-inflamatório e antioxidante por regular negativamente as vias dos fatores de transcrição NF-kB e Nrf2.[87]

O efeito anti-inflamatório de ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 também foi observado no estudo de Bouwens et al.,[89] após o consumo de óleo de peixe por um período de 26 semanas. *Microarray* foi realizado com amostras de células mononucleares de indivíduos que consumiram 1,8 g de EPA + DHA e 4 g de ácido oleico derivado de óleo de girassol. O perfil gênico anti-inflamatório produzido pelos ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 estava principalmente relacionado com a redução da expressão de genes associados com a resposta pró-inflamatória, incluindo os genes alvos do fator de transcrição NF-kB, os quais estão envolvidos na síntese de eicosanoides e de citocinas pró-inflamatórias. O consumo de óleo de girassol produziu efeitos anti-inflamatórios similares, porém com menor intensidade. Observou-se também um perfil antiaterogênico após o consumo de EPA e DHA, caracterizado pela menor expressão de genes envolvidos com o desenvolvimento da aterosclerose, como aqueles das metaloproteinases de matriz e do fator induzido por hipóxia alfa (HIF1 alfa). É importante ressaltar que a subpopulação das células mononucleares está envolvida nos processos de adesão, infiltração e formação de células espumosas.[90] Além disso, o estudo mostrou que o consumo de óleo de peixe resultou em maior expressão de NOS, a qual apresenta efeito protetor contra a formação da placa de ateroma na parede vascular.[89]

Outro estudo avaliou o efeito da suplementação de 8 g de óleo de peixe em indivíduos saudáveis por um período de sete semanas. A análise do *microarray* mostrou que outros mecanismos foram regulados por ácidos graxos poli-insaturados ômega 3, como ciclo celular, estresse do retículo endoplasmático e apoptose. Nesse estudo, observou-se

Tabela 10.2 Resumo dos estudos intervencionais em células mononucleares do sangue periférico envolvendo ácidos graxos poli-insaturados ômega 3

Referência	Quantidade e tipo de ácidos graxos estudados	População	Desenho do estudo	Duração	Metodologia	Principais mecanismos regulados
Pós-prandial						
Bouwens et al. (2010)[82]	Bebidas contendo 55 g de lipídios saturados, mono ou poli-insaturados	21 homens saudáveis	*Crossover* randomizado	6 horas	*Microarray* (AGS *versus* AGPI ômega 3)	Via do fator nuclear LXR, estresse celular e inflamação
Crônico						
Bouwens et al. (2009)[89]	Cápsulas de óleo de peixe (1,8 g ou 0,4 g de EPA + DHA) ou óleo de girassol (4 g de ácido oleico)	111 idosos saudáveis	Paralelo randomizado duplo-cego controlado	26 semanas	*Microarray* (23 AGPI ômega 3 *versus* 25 AGMI)	Inflamação e aterogênese
Rudkowska et al. (2013)[87]	3 g/dia de óleo de peixe (cápsula 1,9 g de EPA e 1,1 g de DHA)	13 homens e 17 mulheres saudáveis	Paralelo randomizado	6 semanas	*Microarray*	Via do fator nuclear PPAR-alfa, inflamação e estresse oxidativo
Myhrstad et al. (2014)[91]	8 g/dia de óleo de peixe (cápsula 0,7 g EPA + 0,9 g DHA) ou 8 g/dia de óleo de girassol	36 homens e mulheres saudáveis	Paralelo randomizado duplo-cego controlado	7 semanas	*Microarray* (AGPI ômega 3 *versus* AGMI)	Ciclo celular, estresse do retículo endoplasmático e apoptose

AGS: ácidos graxos saturados; AGMI: ácidos graxos monoinsaturados; AGPI: ácidos graxos poli-insaturados; DHA: ácido docosa-hexaenoico; EPA: ácido eicosapentaenoico; LXR: receptor X hepático; PPAR-alfa: receptor ativado por proliferador de peroxissomos alfa.

regulação do processo de ciclo celular, caracterizada pelo aumento da expressão de ciclinas e quinases dependentes de ciclinas. Um dado interessante é que a suplementação com óleo de peixe aumentou a expressão de genes envolvidos com o estresse do retículo endoplasmático, como os fatores de transcrição ATF4 e MIF1, responsáveis pela degradação de proteínas.[91] É possível que esses resultados estejam relacionados à quantidade administrada de óleo de peixe, bem como ao tempo de intervenção do estudo.

Comparação entre os efeitos pós-prandiais e crônicos dos ácidos graxos poli-insaturados em células mononucleares do sangue periférico

Com base nos estudos descritos, nota-se que os ácidos graxos poli-insaturados podem afetar a expressão gênica tanto no período pós-absortivo imediato quanto após longo tempo de intervenção. Afman e Müller[74] compararam os dados transcriptômicos de dois estudos, os quais avaliaram os efeitos agudos e crônicos dos ácidos graxos poli-insaturados ômega 3. Dentre os genes alterados em ambos os estudos, 19 apresentavam regulação na mesma direção, refletindo os efeitos do consumo de ácidos graxos poli-insaturados ômega 3. Contudo, dez genes apresentavam regulação contrária, como o gene associado à resposta pró-inflamatória *JUNB*, regulado positivamente na intervenção pós-prandial e negativamente na intervenção crônica. A partir da análise transcriptômica, conclui-se que os ácidos graxos poli-insaturados podem produzir tanto efeito mais pró-inflamatório e pró-oxidativo logo após a refeição quanto efeito sistêmico e mais anti-inflamatório após longo período de intervenção.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Além das funções dos ácidos graxos poli-insaturados no metabolismo energético e na composição dos fosfolipídios de membrana, esses nutrientes atuam na regulação de diferentes processos celulares, como proliferação e diferenciação, acilação de proteínas, inflamação, ativação de enzimas e receptores de membrana e regulação do metabolismo intracelular.

Um dos mecanismos pelos quais ácidos graxos afetam diversos processos biológicos é por meio da regulação da expressão gênica. Dependendo do número de duplas ligações e do comprimento da cadeia de carbonos, ácidos graxos poli-insaturados podem reduzir ou ativar a expressão de diferentes genes por meio da regulação direta da atividade de receptores nucleares, incluindo PPAR, LXR e HNF-4 alfa ou fatores de transcrição, como SREBP e NF-kB; ou indiretamente, por meio de modificações físico-químicas nas propriedades de membrana e ativação de vias de transdução de sinal.

De maneira geral, estudos clínicos randomizados sugerem que o consumo de ácidos graxos poli-insaturados possui efeito antioxidante, anti-inflamatório e regulador do metabolismo lipídico, sobretudo quando dentro de um padrão alimentar adequado.

REFERÊNCIAS

1. Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG et al. The genome sequence of Drosophila melanogaster. Science. 2000;287(5461):2185-95.
2. Giannakou ME, Goss M, Jünger MA, Hafen E, Leevers SJ, Partridge L. Long-lived Drosophila with overexpressed dFOXO in adult fat body. Science. 2004;305(5682):361.
3. Fellows PJ. Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e práticas. 2.ed. Porto Alegre: Artmed; 2006.
4. Simopoulos AP. Evolutionary aspects of diet: the omega-6/omega-3 ratio and the brain. Mol Neurobiol. 2011;44(2):203-15.
5. Horrobin DF. Fatty acid metabolism in health and disease: the role of delta-6-desaturase. Am J Clin Nutr. 1993;57(5 Suppl):732S-736S.
6. Lane K, Derbyshire E, Li W, Brennan C. Bioavailability and potential uses of vegetarian sources of omega-3 fatty acids: a review of the literature. Crit Rev Food Sci Nutr. 2014;54(5):572-79.
7. Spite M. Deciphering the role of n-3 polyunsaturated fatty acid-derived lipid mediators in health and disease. Proc Nutr Soc. 2013;72(4):441-50.
8. Dyerberg J, Bang HO. Haemostatic function and platelet polyunsaturated fatty acids in Eskimos. Lancet. 1979;2(8140):433-35.
9. Salter RH. Aspirin and gastrointestinal bleeding. Am J Dig Dis. 1968;13(1):38-58.
10. Schrör K, Rauch BH. Aspirin and lipid mediators in the cardiovascular system. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2015. pii: S1098-8823(15)30005-8.
11. Samuelsson B. The synthesis and biological role of prostaglandins. Biochem J. 1972;128(1):4P.
12. Samuelsson B, Dahlén SE, Lindgren JA, Rouzer CA, Serhan CN. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. Science. 1987;237(4819):1171-76.
13. Dehkordi NG, Noorbakhshnia M, Ghaedi K, Esmaeili A, Dabaghi M. Omega-3 fatty acids prevent LPS-induced passive avoidance learning and memory and CaMKII-αgene expression impairments in hippocampus of rat. Pharmacol Rep. 2015;67(2):370-75.
14. Suchner U, Kuhn KS, Fürst P. The scientific basis of immunonutrition. Proc Nutr Soc. 2000;59(4):553-63.
15. Campos FG, Waitzberg DL, Logulo AF, Torrinhas RS, Teixeira WG, Habr-Gama A. Immunonutrition in experimental colitis: beneficial effects of omega-3 fatty acids. Arq. Gastroenterol. 2002;39:48-54.
16. Ziegler TR, Leader LM, Jonas CR, Griffith DP. Adjunctive therapies in nutritional support. Nutrition. 1997;13(9 Suppl):64S-72S, 1997.
17. McCowen KC, Bistrian BR. Immunonutrition: problematic or problem solving? Am. J. Clin. Nutr. 2003;77:764-70.
18. Grimm H, Kraus A. Immunonutrition: supplementary amino acids and fatty acids ameliorate immune deficiency in critically ill patients. Langenbecks Arch. Surg. 2001;386:369-376.

19. Kim SF, Huri DA, Snyder SH. Inducible nitric oxide synthase binds, S-nitrosylates, and activates cyclooxygenase-2. Science. 2005;310(5756):1966-70.
20. Serhan CN, Chiang N, Dalli J, Levy BD. Lipid mediators in the resolution of inflammation. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2014;7(2). pii: a016311.
21. Greene ER, Huang S, Serhan CN, Panigrahy D. Regulation of inflammation in cancer by eicosanoids. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2011;96(1-4):27-36.
22. Novak TE, Babcock TA, Jho DH, Helton WS, Espat NJ. NF-kappa B inhibition by omega-3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF-alpha transcription. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2003;284(1):L84-9.
23. Sinha S, Perdomo G, Brown NF, O'Doherty RM. Fatty acid-induced insulin resistance in L6 myotubes is prevented by inhibition of activation and nuclear localization of nuclear factor kappa B. J Biol Chem. 2004;279(40):41294-301.
24. Monteiro J, Leslie M, Moghadasian MH, Arendt BM, Allard JP, Ma DW. The role of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids in the manifestation of the metabolic syndrome in cardiovascular disease and non-alcoholic fatty liver disease. Food Funct. 2014;5(3):426-35.
25. Simopoulos AP. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. Biomed Pharmacother. 2002;56(8):365-79.
26. Smathers RL, Petersen DR. The human fatty acid-binding protein family: evolutionary divergences and functions. Hum Genomics. 2011;5(3):170-91.
27. Bünemann M, Hosey MM. G-protein coupled receptor kinases as modulators of G-protein signalling. J Physiol. 1999;15;517(Pt 1):5-23.
28. Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Olefsky JM et al. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. Cell. 2010;142(5):687-98.
29. Ross JA, Maingay JP, Fearon KC, Sangster K, Powell JJ. Eicosapentaenoic acid perturbs signalling via the NFkappaB transcriptional pathway in pancreatic tumour cells. Int J Oncol. 2003;23(6):1733-38.
30. Whitehouse AS, Tisdale MJ. Increased expression of the ubiquitin-proteasome pathway in murine myotubes by proteolysis-inducing factor (PIF) is associated with activation of the transcription factor NF-kappaB. Br J Cancer. 2003;89:1116-22.
31. Gabler NK, Spencer JD, Webel DM, Spurlock ME. n-3 PUFA attenuate lipopolysaccharide-induced down-regulation of toll-like receptor 4 expression in porcine adipose tissue but does not alter the expression of other immune modulators. J Nutr Biochem. 2008;19(1):8-15.
32. Ichimura A, Hirasawa A, Poulain-Godefroy O, Bonnefond A, Hara T, Yengo L et al. Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human. Nature. 2012;483(7389):350-4.
33. Cintra DE, Ropelle ER, Moraes JC, Pauli JR, Morari J, Souza CT, Grimaldi R, Stahl M, Carvalheira JB, Saad MJ, Velloso LA. Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. PLoS One. 2012;7(1):e30571.
34. Napolitano G, Karin M. Sphingolipids: the oil on the TRAFire that promotes inflammation. Sci Signal. 2010;3(141):pe34.
35. Adhikari A, Xu M, Chen ZJ. Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK. Oncogene. 2007;26(22):3214-26.
36. Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. Nature. 2001; 412(6844):346-51.
37. Matsumura S, Mizushige T, Yoneda T, Iwanaga T, Tsuzuki S, Inoue K et al. GPR expression in the rat taste bud relating to fatty acid sensing. Biomed Res. 2007;28(1):49-55.
38. Horton JD. Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. Biochem Soc Trans. 2002;30(Pt 6):1091-95.
39. Yahagi N, Shimano H, Hasty AH, Amemiya-Kudo M, Okazaki H, Tamura Y et al. A crucial role of sterol regulatory element-binding protein-1 in the regulation of lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids. J Biol Chem. 1999;274(50):35840-44.
40. Xu J, Nakamura MT, Cho HP, Clarke SD. Sterol regulatory element binding protein-1 expression is suppressed by dietary polyunsaturated fatty acids. A mechanism for the coordinate suppression of lipogenic genes by polyunsaturated fats. J Biol Chem. 1999;274(33):23577-83.
41. Lee JN, Kim H, Yao H, Chen Y, Weng K, Ye J. Identification of Ubxd8 protein as a sensor for unsaturated fatty acids and regulator of triglyceride synthesis. Proc Natl Acad Sci USA. 2010;107(50):21424-29.
42. Ou J, Tu H, Shan B, Luk A, DeBose-Boyd RA, Bashmakov Y et al. Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR. Proc Natl Acad Sci USA. 2001;98(11):6027-32.
43. Yoshikawa T, Shimano H, Yahagi N, Ide T, Amemiya-Kudo M, Matsuzaka T et al. Polyunsaturated fatty acids suppress sterol regulatory element-binding protein 1c promoter activity by inhibition of liver X receptor (LXR) binding to LXR response elements. J Biol Chem. 2002;277(3):1705-11.
44. Devarshi PP, Jangale NM, Ghule AE, Bodhankar SL, Harsulkar AM. Beneficial effects of flaxseed oil and fish oil diet are through modulation of different hepatic genes involved in lipid metabolism in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. Genes Nutr. 2013;8(3):329-42.
45. Oelrich B, Dewell A, Gardner CD. Effect of fish oil supplementation on serum triglycerides, LDL cholesterol and LDL subfractions in hypertriglyceridemic adults. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2013;23(4):350-57.
46. Kim HJ, Takahashi M, Ezaki O. Fish oil feeding decreases mature sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1) by down-regulation of SREBP-1c mRNA in mouse liver. A possible mechanism for down-regulation of lipogenic enzyme mRNAs. J Biol Chem. 1999;274(36):25892-98.
47. Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, Vallier P, Frering V, Riou JP et al. Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. Diabetes. 1997;46(8):1319-27.
48. Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauça M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, beta, and gamma in the adult rat. Endocrinology. 1996;137(1):354-66.
49. Kliewer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS et al. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. Proc Natl Acad Sci USA. 1997;94:4318-23.
50. Georgiadi A, Kersten S. Mechanisms of gene regulation by fatty acids. Adv Nutr. 2012;3(2):127-34.
51. Ricote M, Glass CK. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. Biochim Biophys Acta. 2007;1771(8):926-35.

52. Haluzík MM, Haluzík M. PPAR-alpha and insulin sensitivity. Physiol Res. 2006;55(2):115-22.
53. Contreras AV, Torres N, Tovar AR. PPAR-αas a key nutritional and environmental sensor for metabolic adaptation. Adv Nutr. 2013;4(4):439-52.
54. Madsen L, Petersen RK, Kristiansen K. Regulation of adipocyte differentiation and function by polyunsaturated fatty acids. Biochim Biophys Acta. 2005;1740(2):266-86.
55. Grygiel-Górniak B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications - a review. Nutr J. 2014;13:17.
56. Tapia G, Valenzuela R, Espinosa A, Romanque P, Dossi C, Gonzalez-Mañán D et al. N-3 long-chain PUFA supplementation prevents high fat diet induced mouse liver steatosis and inflammation in relation to PPAR-αupregulation and NF-kB DNA binding abrogation. Mol Nutr Food Res. 2014;58(6):1333-41.
57. Zúñiga J, Cancino M, Medina F, Varela P, Vargas R, Tapia G et al. N-3 PUFA supplementation triggers PPAR-αactivation and PPAR-α/NF-kB interaction: anti-inflammatory implications in liver ischemia-reperfusion injury. PLoS One. 2011;6(12):e28502.
58. Li AC, Glass CK. PPAR- and LXR-dependent pathways controlling lipid metabolism and the development of atherosclerosis. J Lipid Res. 2004;45:2161-73.
59. Lehrke M, Lazar MA. The many faces of PPARgamma. Cell. 2005;123(6):993-99.
60. Calder PC. Polyunsaturated fatty acids, inflammatory processes and inflammatory bowel diseases. Mol Nutr Food Res. 2008;52(8):885-97.
61. Lee JY, Zhao L, Youn HS, Weatherill AR, Tapping R, Feng L et al. Saturated fatty acid activates but polyunsaturated fatty acid inhibits Toll-like receptor 2 dimerized with Toll-like receptor 6 or 1. J Biol Chem. 2004;279(17):16971-9. Epub 2004 Feb 13.
62. Lee JY, Plakidas A, Lee WH, Heikkinen A, Chanmugam P, Bray G et al. Differential modulation of Toll-like receptors by fatty acids: preferential inhibition by n-3 polyunsaturated fatty acids. J Lipid Res. 2003;44(3):479-86.
63. Hwang D. Modulation of the expression of cyclooxygenase-2 by fatty acids mediated through toll-like receptor 4-derived signaling pathways. FASEB J. 2001;15(14):2556-64.
64. Singer P, Shapiro H, Theilla M, Anbar R, Singer J, Cohen J. Anti-inflammatory properties of omega-3 fatty acids in critical illness: novel mechanisms and an integrative perspective. Intensive Care Med. 2008;34(9):1580-92.
65. Hsueh HW, Zhou Z, Whelan J, Allen KG, Moustaid-Moussa N, Kim H et al. Stearidonic and eicosapentaenoic acids inhibit interleukin-6 expression in ob/ob mouse adipose stem cells via Toll-like receptor-2-mediated pathways. J Nutr. 2011;141:1260-66.
66. Chapkin RS, Kim W, Lupton JR, McMurray DN. Dietary docosahexaenoic and eicosapentaenoic acid: emerging mediators of inflammation. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2009;81(2-3):187-91.
67. Nakamura MT, Yudell BE, Loor JJ. Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. Prog Lipid Res. 2014;53:124-44.
68. Rajas F, Gautier A, Bady I, Montano S, Mithieux G. Polyunsaturated fatty acyl coenzyme A suppress the glucose-6-phosphatase promoter activity by modulating the DNA binding of hepatocyte nuclear factor 4 alpha. J Biol Chem. 2002; 277(18):15736-44.
69. Vomhof-Dekrey EE, Picklo MJ Sr. The Nrf2-antioxidant response element pathway: a target for regulating energy metabolism. J Nutr Biochem. 2012;23(10):1201-6.
70. Yang YC, Lii CK, Wei YL, Li CC, Lu CY, Liu KL et al. Docosahexaenoic acid inhibition of inflammation is partially via cross-talk between Nrf2/heme oxygenase 1 and IKK/NF-kB pathways. J Nutr Biochem. 2013;24(1):204-12.
71. Ishikado A, Morino K, Nishio Y, Nakagawa F, Mukose A, Sono Y et al. 4-Hydroxy hexenal derived from docosahexaenoic acid protects endothelial cells via Nrf2 activation. PLoS One. 2013;8(7):e69415.
72. Zhang M, Wang S, Mao L, Leak RK, Shi Y, Zhang W et al. Omega-3 fatty acids protect the brain against ischemic injury by activating Nrf2 and upregulating heme oxygenase 1. J Neurosci. 2014;34(5):1903-15.
73. Lee SE, Kim GD, Yang H, Son GW, Park HR, Cho JJ et al. Effects of eicosapentaenoic acid (EPA) on the cytoprotection via Nrf2-mediated heme oxygenase-1 in human endothelial cells. J Cardiovasc Pharmacol. 2015;66(1):108-17.
74. Afman LA, Müller M. Human nutrigenomics of gene regulation by dietary fatty acids. Prog Lipid Res. 2012;51(1):63-70.
75. Khan SA, Vanden Heuvel JP. Role of nuclear receptors in the regulation of gene expression by dietary fatty acids (review). J Nutr Biochem. 2003;14(10):554-67.
76. O'Grada CM, Morine MJ, Morris C, Ryan M, Dillon ET, Walsh M et al. PBMCs reflect the immune component of the WAT transcriptome – implications as biomarkers of metabolic health in the postprandial state. Mol Nutr Food Res. 2014;58(4):808-20.
77. Derosa G, Ferrari I, D'Angelo A, Salvadeo SA, Fogari E, Gravina A et al. Oral fat load effects on inflammation and endothelial stress markers in healthy subjects. Heart Vessels. 2009;24(3):204-10.
78. Herieka M, Erridge C. High-fat meal induced postprandial inflammation. Mol Nutr Food Res. 2014; 58(1):136-46.
79. Liu L, Zhao SP, Wen T, Zhou HN, Hu M, Li JX. Postprandial hypertriglyceridemia associated with inflammatory response and procoagulant state after a high-fat meal in hypertensive patients. Coron Artery Dis. 2008;19(3):145-51.
80. López S, Bermúdez B, Abia R, Muriana FJ. The influence of major dietary fatty acids on insulin secretion and action. Curr Opin Lipidol. 2010;21(1):15-20.
81. Perez-Martinez P, Garcia-Quintana JM, Yubero-Serrano EM, Tasset-Cuevas I, Tunez I, Garcia-Rios A et al. Postprandial oxidative stress is modified by dietary fat: evidence from a human intervention study. Clin Sci (Lond). 2010;119(6):251-61.
82. Bouwens M, Grootte Bromhaar M, Jansen J, Müller M, Afman LA. Postprandial dietary lipid-specific effects on human peripheral blood mononuclear cell gene expression profiles. Am J Clin Nutr. 2010;91(1):208-17.
83. Tiwari RL, Singh V, Barthwal MK. Macrophages: an elusive yet emerging therapeutic target of atherosclerosis. Med Res Rev. 2008;28(4):483-544.
84. Shimano H. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. Prog Lipid Res. 2001;40(6):439-52.
85. Uehara Y, Miura S, von Eckardstein A, Abe S, Fujii A, Matsuo Y et al. Unsaturated fatty acids suppress the expression of the ATP--binding cassette transporter G1 (ABCG1) and ABCA1 genes via an LXR/RXR responsive element. Atherosclerosis. 2007;191(1):11-21.
86. Uehara Y, Engel T, Li Z, Goepfert C, Rust S, Zhou X et al. Polyunsaturated fatty acids and acetoacetate downregulate the expression of the ATP-binding cassette transporter A1. Diabetes. 2002;51(10):2922-28.
87. Rudkowska I, Paradis AM, Thifault E, Julien P, Tchernof A, Couture P et al. Transcriptomic and metabolomic signatures of an

n-3 polyunsaturated fatty acids supplementation in a normolipidemic/normocholesterolemic Caucasian population. J Nutr Biochem. 2013;24(1):54-61.
88. Nakamura MT, Cheon Y, Li Y, Nara TY. Mechanisms of regulation of gene expression by fatty acids. Lipids. 2004;39(11):1077-83.
89. Bouwens M, van de Rest O, Dellschaft N, Bromhaar MG, de Groot LC, Geleijnse JM et al. Fish-oil supplementation induces anti-inflammatory gene expression profiles in human blood mononuclear cells. Am J Clin Nutr. 2009;90(2):415-24.
90. Hansson GK, Robertson AK, Söderberg-Nauclér C. Inflammation and atherosclerosis. Annu Rev Pathol. 2006;1:297-329.
91. Myhrstad MC, Ulven SM, Günther CC, Ottestad I, Holden M, Ryeng E et al. Fish oil supplementation induces expression of genes related to cell cycle, endoplasmic reticulum stress and apoptosis in peripheral blood mononuclear cells: a transcriptomic approach. J Intern Med. 2014;276(5):498-511.

Ácidos graxos monoinsaturados 11

Milessa da Silva Afonso
Maria Silvia Ferrari Lavrador
Ana Maria Pita Lottenberg

INTRODUÇÃO

Os ácidos graxos monoinsaturados apresentam apenas uma dupla ligação e são disponibilizados na dieta por diversos alimentos, tanto de origem vegetal quanto animal. As principais fontes vegetais são azeite de oliva, óleo de canola, oleaginosas (castanhas, nozes, avelãs etc.) e abacate. As carnes bovinas são as principais fontes animais de ácidos graxos monoinsaturados e representam 50% do total de lipídios presentes nesse alimento. Classificam-se em duas séries, respectivamente, ômega-7 e ômega-9, cujas duplas ligações localizam-se, respectivamente, nos átomos de carbono 7 e 9, a partir do grupamento metila terminal. Os principais ácidos graxos monoinsaturados na configuração *cis*, ou seja, apresentando átomos de hidrogênio ao mesmo lado da dupla ligação, são os ácidos miristoleico (14:1, ômega-7), palmitoleico (16:1, ômega-7), oleico (18:1, ômega-9), eicosenoico (20:1, ômega-9), erúcico (22:1, ômega-9) e nervônico (C24:1, ômega-9), enquanto os ácidos vacênico (18:1, 11*t*) e elaídico (18:1, 9*t*) apresentam-se na configuração *trans*. Entre os monoinsaturados na forma *cis*, o ácido oleico é o mais abundante, representando aproximadamente 92% do total de ácidos graxos monoinsaturados ingeridos na dieta. Além de o ácido oleico ser o mais consumido, é também o mais abundante no corpo humano, originando-se predominantemente do consumo alimentar, mas também da síntese endógena.[1] Essa reação é catalisada sob ação da estearoil-CoA dessaturase 1 (SCD-1), enzima que insere uma dupla ligação no carbono 9 do ácido palmítico ou esteárico, originando os ácidos palmitoleico e oleico, respectivamente.[2]

Historicamente, os benefícios do ácido oleico sobre o risco cardiovascular foram evidenciados a partir dos resultados do Seven Countries Study.[3] Apesar da conclusão desse relevante estudo epidemiológico, a análise de dados populacionais posteriores mostrou resultados controversos quanto à ação isolada do ácido oleico sobre a redução de risco e desfechos cardiovasculares. Alguns estudos demonstraram pequeno aumento de risco,[4] enquanto outros mostraram efeito neutro[5-7] ou menor risco[8,9]. É provável que essas discrepâncias possam ser explicadas pela ausência da subanálise da ingestão dos diferentes ácidos graxos monoinsaturados da dieta, os quais podem advir de diferentes fontes alimentares. Por exemplo, dependendo da população estudada, o consumo de ácido oleico pode ser proveniente da carne (dieta ocidental) ou do azeite de oliva (dieta europeia). As conclusões obtidas em recente metanálise mostraram que apenas o ácido oleico proveniente do azeite de oliva é capaz de reduzir o risco de todas as causas de mortalidade (11%), mortalidade cardiovascular (12%), eventos cardiovasculares (9%) e acidente vascular cerebral (AVC; 17%) quando se comparou o maior ao menor consumo de ácido oleico e a razão MONO/SAT.[10]

A importância do consumo do ácido oleico foi especialmente evidenciada em estudos baseados na dieta do Mediterrâneo, caracterizada principalmente pelo alto consumo de azeite de oliva, frutas, hortaliças e grãos. A relevância desse padrão alimentar sobre a diminuição de morbidade e mortalidade cardiovascular foi mostrada no estudo *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition* (Epic)[11,12] e mais recentemente no estudo *Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet* (Predimed).[13] Neste último, foram estudados indivíduos com alto risco cardiovascular e verificou-se que o consumo de azeite de oliva ou nozes reduziu a incidência dos principais eventos cardiovasculares.[13] Em razão do seu potencial benefício sobre a prevenção primária

e secundária da doença cardiovascular, a diretriz da Sociedade Americana de Cardiologia[14] e a I Diretriz Brasileira sobre o Consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular recomendam o consumo de até 20% do valor calórico total na forma de ácidos graxos monoinsaturados.[15]

Concomitantemente à condução dos estudos clínicos e epidemiológicos, o avanço da nutrigenômica permitiu o aprofundamento dos mecanismos pelos quais o ácido oleico reduz o risco cardiovascular. Dessa forma, neste capítulo serão abordadas as ações do ácido oleico sobre vias de sinalização intracelulares envolvidas na absorção intestinal, na homeostase de lipídios nos tecidos hepático e adiposo e nas concentrações plasmáticas de lipoproteínas e, por fim, sobre o desenvolvimento da placa aterosclerótica.

MECANISMOS MOLECULARES DO ÁCIDO OLEICO

Colesterolemia

O ácido oleico não eleva as concentrações plasmáticas de colesterol e LDL-colesterol quando comparado à gordura saturada.[16-18] Uma das possíveis razões para esse efeito neutro do ácido oleico sobre a colesterolemia é que esse ácido graxo é um substrato preferencial para a enzima acil-CoA: colesterol aciltransferase (ACAT) no fígado. Localizada no retículo endoplasmático, essa enzima promove a esterificação do colesterol, reduzindo o *pool* de colesterol livre na célula, o que induz a atividade dos receptores de LDL.[19] Posteriormente, estudos de biologia molecular facilitaram a compreensão do envolvimento do ácido oleico em importantes vias relacionadas à homeostase de colesterol.

A homeostase intracelular de lipídios é regulada por uma família de fatores de transcrição residentes na membrana do retículo endoplasmático; eles são conhecidos como proteínas ligadoras ao elemento responsivo a esteróis (SREBP).[20] O genoma humano codifica três isoformas principais, SREBP-1a, SREBP-1c e SREBP-2, sendo a última associada à regulação do equilíbrio intracelular de colesterol no tecido hepático. Esse fator de transcrição exerce um papel fundamental no controle da expressão de genes que codificam o receptor de LDL (B/E) e a enzima HMG CoA redutase, responsável pela síntese endógena de colesterol.[20] Desta forma, sob adequadas concentrações intracelulares de esteróis (colesterol e oxisteróis), a SREBP-2 permanece ancorada na membrana do retículo endoplasmático por estar complexada a outras duas proteínas, a INSIG (gene induzido por insulina) e a SCAP (proteína ativadora da clivagem de SREBP), fatores que impedem sua translocação nuclear e, consequentemente, sua ação transcricional.[21] Além disso, a presença de precursores de colesterol direciona a degradação proteassomal da HMG CoA redutase,[22] reduzindo a síntese endógena de colesterol. Entretanto, na vigência de baixas concentrações de esteróis, ocorre a degradação de INSIG em um processo mediado pela UBXD8, a qual é necessária para a degradação proteassomal de proteínas associadas ao retículo endoplasmático. Essa degradação favorece a liberação do complexo SCAP-SREBP para o Golgi, organela onde o SREBP sofrerá duas clivagens proteolíticas para sua maturação e translocação nuclear. Desta forma, a ativação de UBXD8 e, consequentemente, a degradação de INSIG induz a transcrição do receptor B/E e da HMG-CoA redutase, proporcionando aumento nas concentrações intracelulares de colesterol.[21,23] Nesse contexto, o ácido oleico não induz aumento da colesterolemia porque inibe a maturação proteolítica e a translocação nuclear do SREBP-2, uma vez que impede a atuação da proteína UBXD8, reduzindo a degradação e proporcionando a estabilidade da INSIG.[23-26]

Os efeitos do ácido oleico não ficam restritos apenas ao SREBP-2, mas também se aplicam ao SREBP-1c. Com atividade transcricional regulada tanto pela insulina[27] quanto pelo receptor nuclear X hepático (LXR-alfa),[28] o SREBP-1c transcreve genes que codificam para proteínas envolvidas na síntese de ácidos graxos, como ácido graxo sintase (FAS), glicerol-3-fosfatase-aciltransferase (GPAT), acil CoA carboxilase (ACC) e a própria SCD-1.[29] Por antagonizar a ação do LXR, o ácido oleico inibe a atividade transcricional da SREBP-1c, reduzindo a síntese hepática de triacilgliceróis.[30,31]

Tecido hepático

O fluxo de ácidos graxos no fígado é proveniente da liberação dos triacilgliceróis presentes nos quilomícrons, da lipólise do tecido adiposo e da lipogênese *de novo*.[32] O ácido oleico pode prevenir o acúmulo de triacilgliceróis no fígado por atuar sobre vias lipolíticas e lipogênicas. Essas vias são controladas no tecido hepático pelos membros da família de coativadores da transcrição gênica PGC-1.[33] Com duas isoformas principais, o PGC-1beta ativa a via lipogênica por regular a atividade transcricional do SREBP-1c,[33] enquanto o PGC-1alfa participa da via lipolítica induzindo a beta-oxidação mitocondrial de ácidos graxos.[34,35] O ácido oleico é capaz de ativar ambas as isoformas, embora sua ação seja mais pronunciada sobre PGC-1alfa, que induz o receptor ativado por proliferação de peroxissomos-alfa (PPAR-alfa), culminando em aumento da expressão da enzima carnitina palmitoil transferase-1 (CPT1), envolvida na beta-oxidação de ácidos graxos.[36] Além disso, a ativação de PGC-1alfa mediada pelo ácido oleico possui efeito anti-inflamatório, pois

promove a formação de um complexo PGC-1alfa/NFkB/c-maf, o qual se desloca para o núcleo e se liga à região promotora para transcrição do gene que codifica a interleucina (IL)-10.[34] As ações do ácido oleico sobre o processo inflamatório incluem, ainda, a redução na ativação das serinas quinases (IKKbeta, JNK) e dos receptores de TNF-alfa,[36] bem como a ativação do PPAR-delta, um receptor nuclear que pode induzir a polarização fenotípica de macrófagos da classe pró-inflamatória M1 para anti-inflamatória M2.[37] Além desse efeito, a ativação de PPAR-delta também aumenta a beta-oxidação de ácidos graxos e melhora a sensibilidade à insulina por reduzir a expressão da fosfatase homóloga a tensina (PTEN), uma proteína antagônica à ação de proteínas envolvidas na cascata de sinalização da insulina, especialmente a fosfatidil inositol 3 quinase (PI3K).[38-40]

A ativação crônica de vias lipogênicas no tecido hepático contribui para o desenvolvimento da esteatose hepática não alcoólica, caracterizada pelo acúmulo intracelular de triacilgliceróis em mais de 5% dos hepatócitos.[41] Estudos conduzidos em animais demonstram que o ácido oleico não induz vias lipogênicas e, consequentemente, o acúmulo de lipídios no tecido hepático.[30,42] Entretanto, os dados envolvendo a ação do ácido oleico sobre a esteatose devem ser avaliados com cautela, em razão da dificuldade de se separar o ácido oleico proveniente dos lipídios da dieta e aquele sintetizado endogenamente via SCD-1. Os ácidos graxos monoinsaturados resultantes da ação da SCD-1 induzem a esteatose em maior grau que os consumidos via dieta por ativarem a expressão de genes lipogênicos.[43] Essa ação é atribuída à maior capacidade de os ácidos graxos monoinsaturados provenientes de vias endógenas serem incorporados em lipídios não polares.[44] Esse efeito se deve, provavelmente, à colocalização da SCD-1 com a diacilglicerol aciltransferase 2 (DGAT2), proteína responsável pela esterificação do ácido graxo na molécula de glicerol.[45]

O acúmulo de triacilgliceróis também pode ser resultante da menor remoção de lipídios do tecido hepático. Tanto o colesterol quanto os triacilgliceróis sintetizados no fígado são incorporados à apolipoproteína B100 (apoB100) com auxílio da proteína de transferência microssomal de triacilgliceróis (MTTP), formando as VLDL, que serão secretadas na circulação sanguínea.[46] O ácido oleico reduz a secreção de lipoproteínas por diminuir o conteúdo proteico de apoB e de MTTP.[47] Apesar de ser considerada um efeito deletério, a redução da expressão dessas proteínas é consequência da menor disponibilidade de triacilgliceróis nos hepatócitos induzida pelo ácido oleico.

A persistência do acúmulo de lipídios culmina também em inflamação, apoptose e fibrose do tecido hepático, eventos que caracterizam a esteato-hepatite não alcoólica.[48] Nos diferentes estágios da doença hepática (esteatose e esteato-hepatite não alcoólica), ocorre a ativação do estresse do retículo endoplasmático,[49] condição caracterizada pelo acúmulo de proteínas mal enoveladas nessa organela. Esse acúmulo induz uma resposta adaptativa conhecida como resposta a proteínas mal enoveladas (UPR, *unfolded protein response*), na qual estão ativadas as proteínas PERK (*protein kinase RNA-like ER kinase*), IRE1 (*inositol requiring protein-1*) e ATF6 (*activating transcription factor-6*). Residentes na membrana do retículo endoplasmático, essas proteínas são ativadas de acordo com a duração e a intensidade do estresse, podendo culminar com a indução da sinalização pró-apoptótica.[50] Comparado aos ácidos graxos saturados, o ácido oleico não induz estresse do retículo endoplasmático,[51] o que contribui para a redução da ativação de vias apoptóticas. De fato, o ácido oleico reduz a translocação da proteína pró-apoptótica BAX (*Bcl2-associated X*) para o lisossomo, impedindo, desta forma, a liberação de catepsina B, uma proteína associada ao aumento do estresse oxidativo intracelular por promover a disfunção mitocondrial.[52,53] Portanto, quando comparado ao ácido graxo saturado, o ácido oleico impede a ativação de vias associadas à apoptose, induzindo menor expressão de quinases do tipo amino-terminal c-Jun (JNK) e atividade de caspase 3/7.[54]

É importante ressaltar que todas as ações benéficas do ácido oleico são obtidas mediante o consumo de dietas com quantidade adequada de lipídios totais, uma vez que animais submetidos a uma dieta com ração hiperlipídica enriquecida com ácido oleico apresentam acúmulo de lipídios no tecido hepático de forma similar aos que ingerem rações ricas em gordura saturada.[55]

Absorção intestinal

A passagem do ácido oleico pela membrana plasmática do enterócito é fundamental para sua utilização nos demais tecidos. No lúmen intestinal, estão presentes ácidos graxos livres e 2-monoacilglicerol (2-MAG) formados após a atuação das lipases estomacal e pancreática. Esses lipídios podem ser absorvidos tanto na forma passiva quanto mediada por proteínas de membrana.[56] A absorção dos ácidos graxos de cadeia longa por uma via independente de proteínas de membrana envolve um processo conhecido como *flip flop*. Caracterizado pela passagem do ácido graxo da camada externa para a camada interna da membrana celular, esse mecanismo é facilitado em pH fisiológico, uma vez que a forma protonada do ácido graxo atravessa a bicamada lipídica de forma espontânea.[57] Como o ácido oleico possui uma dupla

ligação na cadeia carbônica, sua incorporação nas membranas favorece alterações necessárias para o aumento da permeabilidade de prótons mediada pelos canais de água, tornando o movimento de *flip flop* mais rápido.[58] Entretanto, foi demonstrado em células da linhagem intestinal humana (Caco-2) que a captação de ácido oleico, tanto na forma livre quanto ligada ao glicerol (2-mono-oleina), é um processo saturável e dependente de proteína.[59] Nesse contexto, estão envolvidas a proteína *fatty acid transporter* (FAT/CD36), a qual é bastante expressa no intestino,[60] e as *fatty acid transport proteins* (FATP), principalmente a isoforma 4.[61] O receptor CD36 facilita a absorção de ácido oleico especialmente nas porções proximais do intestino delgado,[60,62] enquanto a FATP4 parece estimular o transporte de ácido oleico pela membrana por exibir uma atividade sintetase de acil CoA graxo de cadeia longa,[63] favorecendo sua reesterificação para síntese de triacilgliceróis.[64] Além dessas proteínas, foi descrito mais recentemente que o ácido oleico também é absorvido a partir da formação de vesículas endocíticas em um processo envolvendo proteínas associadas aos *lipid rafts* da membrana da borda em escova, especialmente a caveolina-1 e a fosfatase alcalina intestinal.[65]

Os ácidos graxos internalizados e tioesterificados com a coenzima A (CoA) são reesterificados para a síntese de triacilgliceróis, os quais são transferidos para o compartimento interno do retículo endoplasmático pela proteína de transferência microssomal de triacilgliceróis (MTTP).[56] Por interagir fisicamente com a apoB48, a MTTP possibilita a sua lipidação inicial,[66] razão pela qual essa proteína é reconhecida como o fator mais importante para regular a formação e a secreção de lipoproteínas que contenham apoB, ou seja, quilomícrons (apoB48) pelo intestino e VLDL (apoB100) pelo fígado.[67] O ácido oleico praticamente dobra a secreção de quilomícrons quando comparado aos ácidos graxos saturados, por aumentar a expressão de apoB48 e também por ser substrato preferencial para translocação pela MTTP.[68,69]

Concomitantemente a todos esses eventos, o colesterol proveniente da dieta e presente na bile é captado no lúmen intestinal pela proteína *Niemann-Pick C1 like 1* (NPC1L1) e esterificado no retículo endoplasmático pela enzima ACAT2.[70] Uma pequena quantidade de colesterol permanece na forma livre e pode retornar ao lúmen intestinal por meio de transportadores, que promovem a remoção intracelular de colesterol mediado por gasto energético, denominados *ATP binding cassette* G5 (ABCG5) e G8 (ABCG8).[71] O colesterol livre pode ser removido ainda via HDL por um transportador também pertencente à família ATP *binding cassette,* o ABCA1, cujas ações serão mais bem exploradas adiante.

Diferente dos ácidos graxos poli-insaturados, o ácido oleico não reduz os transcritos nem a expressão de NPC1L1 e, ainda, não promove a remoção de colesterol mediada pelas proteínas da membrana da borda em escova ABCG5 e ABCG8.[72,73] Esses eventos poderiam culminar com o acúmulo de colesterol livre no enterócito; entretanto, o ácido oleico é o substrato preferencial da enzima ACAT, responsável por sintetizar ésteres de colesterol,[74] os quais são incorporados e secretados nos quilomícrons. Desta forma, a menor remoção de colesterol presente no enterócito pelos transportadores ABC é resultado da menor disponibilidade de colesterol livre.[73]

Os lipídios incorporados nos quilomícrons sofrem ação da lipoproteína lipase (LPL), localizada no endotélio dos capilares de todos os tecidos extra-hepáticos, liberando ácidos graxos na circulação. A LPL favorece a ligação de quilomícrons e VLDL às superfícies celulares e seus receptores[75] e é controlada por mecanismos pós-transcricionais. Três proteínas são capazes de inibir sua atividade: as proteínas semelhantes à angiopoietina (Angptl) 3, 4 (Fiaf) e 8. Em especial, a transcrição da Angptl4 é controlada pelos ácidos graxos e pelos PPAR. Ambos reduzem a atividade dessa proteína, o que aumenta a expressão da LPL, contribuindo para alterações no metabolismo de triacilgliceróis em vários tecidos.[76] O ácido oleico, quando comparado aos ácidos palmítico, mirístico, linoleico e linolênico, tem maior afinidade pela Angptl4, o que contribui para o estímulo da atividade de LPL.[77]

A atividade da LPL promove a formação dos remanescentes de quilomícrons, que são reconhecidos por receptores de LDL (tipo B/E) ou pela proteína análoga ao receptor de LDL (LRP-1) e, em seguida, são catabolizados no fígado.[46,78]

Saciedade

Os ácidos graxos alimentares influenciam diferentes vias envolvidas na regulação da saciedade e diversos estudos evidenciaram o papel do ácido oleico nesse processo. Acredita-se que uma das vias pelas quais o ácido oleico possa induzir saciedade é pelo estímulo da secreção de colecistocinina (CCK), uma vez que o uso de um antagonista do receptor desse hormônio bloqueou as respostas anorexigênicas em ratos que receberam infusão duodenal desse ácido graxo.[79] A CCK é secretada pelas células I do duodeno e estimula a contração da vesícula biliar, a secreção de enzimas pancreáticas, além de retardar o esvaziamento gástrico, promovendo a saciedade.[80-82] Contudo, para que o ácido oleico exerça esses efeitos, deve ser reconhecido por receptores presentes nas células I. Esse reconhecimento é feito preferencialmente pela família dos receptores acoplados à proteína G (GPR), os quais

são capazes de reconhecer tanto ácidos graxos de cadeia longa (GPR40/FFAR1 e GPR120/FFAR4) quanto de cadeia curta (GPR43/FFAR2 e GPR41/FFAR3).[83] As ações do ácido oleico sobre a liberação de CCK parecem ser mediadas pelo receptor GPR40.[84-86]

Além da sua ação sobre a CCK, o efeito do ácido oleico sobre a saciedade parece envolver a secreção de incretinas pelas células L,[87] as quais se localizam na porção distal do intestino delgado e no cólon. Essas células são responsáveis por secretar o peptídeo análogo ao glucagon (GLP-1), hormônio com efeitos insulinotrópicos sobre as células beta e que também está envolvido no processo de saciedade.[88-89]

Ao contrário dos ácidos graxos saturados, o ácido oleico estimula a secreção de GLP-1 pelas células L em um mecanismo envolvendo a ativação da proteína quinase C atípica (PKC-zeta), a qual está envolvida na regulação da secreção de insulina mediada por ácidos graxos de cadeia longa.[90,91] Comprovando os efeitos benéficos do ácido oleico sobre a secreção de incretinas, foi demonstrado em ratos Zucker que a ingestão de ração normolipídica contendo azeite de oliva, por 2 semanas, melhorou a tolerância à glicose quando comparados aos ratos que ingeriram óleo de coco.[91] Nesse mesmo contexto, em adultos jovens magros e também em diabéticos, a concentração de GLP-1 foi maior mediante o consumo de azeite de oliva quando comparado à margarina, o que confirma a relação entre a composição de ácidos graxos e a secreção de incretinas no período pós-prandial.[92,93]

Outro efeito do ácido oleico sobre a saciedade está envolvido no seu papel como precursor de uma molécula sinalizadora conhecida como oleoiletanolamida,[94] capaz de induzir saciedade por mecanismos envolvendo não apenas a inervação vagal, mas também neurônios localizados no núcleo do trato solitário do hipotálamo.[95,96] De fato, neurônios especializados presentes no núcleo arqueado do hipotálamo induzem a saciedade mediante estímulos de hormônios secretados por tecidos periféricos, como leptina e insulina. Entretanto, o consumo de dietas ricas em lipídios ativa vias inflamatórias no hipotálamo, prejudicando a ação anorexigênica da insulina.[97] O ácido oleico atenua a inflamação e a resistência à insulina e à leptina no hipotálamo, além de aumentar a expressão de pró-opiomelanocortina (POMC) e do transcrito regulado por cocaína e anfetamina (CART), ambos associados à via anorexigênica no núcleo arqueado.[98] Essa ação está associada à capacidade de o ácido oleico ativar o receptor GPR120, possibilitando a sua associação com a proteína beta-arrestina 2. Essa associação impede a ativação transcricional do fator nuclear kappa B (NF-κB) por dissociar as proteínas TAK1 (*transforming growth factor*-beta *activated kinase 1*) e TAB1 (*TAK1 binding protein-1*), que são duas proteínas *upstream* à via de sinalização do NF-κB.[99]

Apesar da importante associação do ácido oleico sobre a promoção da saciedade, sua ação pode ser comprometida pela ingestão de dietas hiperlipídicas a longo prazo.[100]

Microbiota intestinal

Muitos estudos têm evidenciado a importância da microbiota intestinal sobre o risco de desenvolver doenças crônicas não transmissíveis (DCNT).[101-103] Já está bem estabelecido que dietas ricas em lipídios alteram a composição da microbiota, aumentando a razão *Firmicutes*/*Bacteroidetes*, fator que interfere na permeabilidade intestinal, induzindo maior absorção de lipopolissacarídeos (LPS),[104-105] causando endotoxemia metabólica, o que favorece a ocorrência de um quadro de inflamação de baixo grau, a qual é observada especialmente na obesidade. Esses eventos contribuem para a ativação do processo inflamatório e o prejuízo na via de sinalização da insulina, e associam-se a maior adiposidade tanto em animais quanto em humanos.[101,102]

Até o momento, poucos estudos avaliaram especificamente o efeito do ácido oleico sobre a microbiota intestinal. A suplementação de ração rica em lipídios com um composto derivado do ácido oleico aumentou a quantidade de *Bifidobacterias* e reduziu *Enterobacterias* e *Clostridium,* favorecendo a redução do peso corporal de camundongos.[106] Demonstrou-se também que, em camundongos alimentados por oito semanas com rações hiperlipídicas (45% do valor calórico total provenientes de lipídios) contendo ácido oleico, a razão *Firmicutes*/*Bacteroidetes* foi menor em comparação à ração contendo ácido graxo saturado (óleo de palma), o que proporcionou menor ganho de peso e menor acúmulo de lipídios no tecido hepático.[107]

Aterosclerose

Estudos epidemiológicos e clínicos estabeleceram os efeitos benéficos dos ácidos graxos insaturados sobre o risco cardiovascular, em especial por influenciarem favoravelmente a concentração plasmática de lipídios. Com o avanço da nutrigenômica, foi possível descobrir os mecanismos moleculares envolvidos nesses eventos.

Durante o desenvolvimento da aterosclerose, as concentrações plasmáticas de LDL exercem o principal papel, uma vez que a retenção dessa lipoproteína no espaço subendotelial favorece sua modificação por processos oxidativos.[108-110] Uma vez oxidada, a partícula de LDL é capaz de estimular a ativação endotelial, caracterizada

pelo aumento da expressão de moléculas de adesão, como as selectinas E e P e as moléculas de adesão da célula vascular-1 (VCAM-1) e intercelular-1 (ICAM-1),[108,110-112] bem como da proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), contribuindo para o recrutamento de células inflamatórias para o local propenso à formação da lesão.[113] Nesse contexto, partículas de LDL de indivíduos que consomem dietas ricas em ácidos graxos monoinsaturados são mais resistentes à oxidação quando comparadas às partículas LDL de indivíduos que consomem dietas ricas em ácidos graxos saturados e poli-insaturados.[114] Em virtude do alto consumo de ácido oleico, a população grega também apresenta partículas de LDL mais resistentes à oxidação, evento que proporciona menor adesão de monócitos nas células endoteliais pré-incubadas com as LDL desses indivíduos.[115,116] Esse efeito está associado à capacidade de o ácido oleico inibir a expressão de genes que codificam as moléculas de adesão VCAM-1 e ICAM-1, bem como a E selectina.[117]

Além de diminuir a adesão e o recrutamento de células inflamatórias para o espaço subendotelial, o ácido oleico também reduz a transcrição do gene que codifica o fator estimulante da colônia de macrófagos quando comparado ao ácido graxo saturado esteárico.[118] Esse efeito do ácido oleico sobre a diferenciação de monócitos a macrófagos é um passo crucial para a redução do risco de desenvolver a aterosclerose, já que são os macrófagos que possuem os receptores *scavenger* ou receptores depuradores, como *lectin-like* oxLDL (LOX-1), *cluster of differentiation* 36 (CD36) e *class A* e *B scavenger receptors* (SRA e SR-BI, respectivamente), responsáveis pela captação da LDL modificada.[109,110,119]

Dentre esses receptores, o ácido oleico diminui a expressão de CD36 em macrófagos da linhagem humana U937 e THP-1 quando comparado aos ácidos graxos saturados, culminando em menor captação de LDL modificadas.[120] Além disso, o ácido oleico também atenua a expressão de LOX-1 causada pelos ácidos graxos saturados, especialmente por reduzir a expressão de proteínas PERK (*protein kinase-like ER kinase*), eIF2alfa (*eukaryotic translation initiation factor 2*alfa) e JNK (*c-JUN N-terminal kinase*), todas envolvidas na via do estresse do retículo endoplasmático.[121-122]

Os efeitos do ácido oleico sobre esses mecanismos são relevantes porque a captação de LDL modificadas e, portanto, o acúmulo de colesterol e seus metabólitos oxidados (oxisteróis) nos macrófagos contribui para a formação das células espumosas, as quais são capazes de propagar ainda mais a resposta inflamatória, secretando maior quantidade de mediadores inflamatórios e moléculas quimioatraentes.[109,119]

Entretanto, a captação de partículas de LDL e também a remoção intracelular de colesterol são fundamentais para a manutenção da homeostase de colesterol nos macrófagos, impedindo assim a formação da célula espumosa. A remoção de colesterol está inserida no transporte reverso de colesterol, processo no qual a apo A-I, principal proteína da HDL, remove o colesterol celular por interação com o transportador ABCA-1, enquanto a HDL remove colesterol por interação com ABCG-1. Após a captação de colesterol pelos aceptores extracelulares (apo A-I e HDL), a HDL madura conduzirá o colesterol dos tecidos periféricos para o fígado para secreção biliar.[123] A expressão das proteínas da família ABC é estimulada em resposta às altas concentrações intracelulares de colesterol e seus produtos oxidados, conhecidos como oxisteróis, os quais são ligantes do receptor nuclear LXR e, portanto, induzem a heterodimerização LXR/RXR, favorecendo a transcrição de genes que codificam ABCA-1 e ABCG-1.[124]

De forma geral, ácidos graxos insaturados, como o oleico, reduzem a disponibilidade dos transportadores da família ABC na membrana plasmática, reduzindo a eficiência de remoção intracelular de colesterol. Os mecanismos moleculares que explicam essa ação envolvem a repressão transcricional que esses ácidos graxos exercem sobre o LXR, uma vez que competem com os oxisteróis pela ligação a esse receptor nuclear.[125,126] Entretanto, o ácido oleico também parece atuar em nível pós-traducional, por induzir a fosforilação dos resíduos de serina do ABCA-1, o que desestabiliza a estrutura da proteína e facilita sua degradação.[127,128] É importante ressaltar que o ácido oleico reduz de forma significativa a captação de LDL oxidada pelo macrófago, não induzindo o acúmulo de lipídios e, consequentemente, a transcrição de proteínas que removam o colesterol celular. Além disso, conforme citado anteriormente, por ser substrato preferencial da ACAT, o ácido oleico reduz a disponibilidade de colesterol livre para remoção mediada pelos transportadores ABC.[73] Ainda, mediante atividade da ACAT, a conversão de colesterol livre para esterificado protege a célula contra a indução do processo de apoptose mediado pela ativação do estresse do retículo endoplasmático.[129,130] Mais recentemente, também foi descrito que o acúmulo de colesterol livre favorece a formação de cristais de colesterol, os quais são capazes de ativar o inflamassoma, um complexo proteico envolvido no processamento e maturação da IL-1beta e IL-18.[131,132] Por todos os eventos aqui descritos, o ácido oleico não induz a ativação do inflamassoma e até mesmo atenua a ação dos ácidos graxos saturados sobre a maturação de IL-1beta e a atividade de caspase-1, sendo a última associada à apoptose de macrófagos.[133]

Já está bem estabelecido que a apoptose tanto de macrófagos quanto de células musculares lisas e endoteliais, juntamente com um ambiente pró-inflamatório, pró-coagulante e proteolítico, contribui para a vulnerabilidade da placa aterosclerótica. Tal condição favorece a ruptura da placa, incorrendo a eventos como oclusão arterial e processos aterotrombóticos.[119,134] Desta forma, mediante o consumo de dietas normolipídicas, o ácido oleico reduz o risco de desenvolver aterosclerose, por reduzir a expressão e atividade de proteínas envolvidas em vias de sinalização pró-apoptóticas e pró-inflamatórias.

Tecido adiposo

O tecido adiposo é um órgão endócrino com intensa atividade metabólica, especializado no armazenamento energético sob a forma de triacilgliceróis.[135] O consumo de dietas hipercalóricas associado ao menor gasto energético resulta em hipertrofia e hiperplasia desse tecido, com aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias e pró-coagulantes e de moléculas quimioatraentes implicadas nas alterações metabólicas da obesidade.[136,137]

O tipo de ácido graxo presente na dieta pode, entre outros fatores, alterar a homeostase de lipídios no tecido adiposo, atuando em vias de sinalização envolvidas no controle da expressão e atividade de enzimas lipolíticas e lipogênicas. Nos adipócitos, o ácido oleico apresenta efeito neutro sobre a morfologia e o acúmulo de lipídios, pois não interfere na expressão da SCD-1, já que esse ácido graxo é um dos produtos finais da ação dessa proteína.[138] Embora não altere também a expressão da enzima lipolítica designada lipase hormônio sensível, o ácido oleico induz a expressão da lipase de lipoproteína, enzima lipolítica com importante ação na diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos.[138,139] Esse efeito é considerado benéfico, uma vez que os pré-adipócitos — células presentes na fração do estroma vascular do tecido adiposo — compartilham diversas características fenotípicas com macrófagos pró-inflamatórios, incluindo a capacidade de secretar citocinas pró-inflamatórias, como TNFalfa, IL-6 e MCP-1.[140,141] A MCP-1 está associada ao recrutamento de monócitos e ao acúmulo de macrófagos no tecido adiposo, e as dietas ricas em lipídios promovem a polarização desses macrófagos para o fenótipo pró-inflamatório (macrófagos M1),[142] propagando ainda mais o processo inflamatório nesse tecido. O ácido oleico parece induzir a polarização de macrófagos para o fenótipo anti-inflamatório M2, caracterizado pela presença dos marcadores CD206, MGL1 e ARG1 no tecido adiposo mesentérico.[143] Comprovando essa ação do ácido oleico, o tecido adiposo subcutâneo de indivíduos com sobrepeso que consomem dietas contendo ácidos graxos monoinsaturados apresenta expressão de genes associados a um perfil anti-inflamatório significativamente maior quando comparado a indivíduos que consomem dietas contendo ácidos graxos saturados.[144]

Além disso, independentemente da concentração utilizada, o ácido oleico não estimula a via de sinalização do NF-kB,[145,146] exercendo um efeito neutro sobre a expressão de biomarcadores pró-inflamatórios, como IL-6 e MCP-1.[138]

O tecido adiposo desempenha papel importante na homeostase da glicose, pois secreta adipocinas (TNFalfa, IL-6, resistina e adiponectina) associadas à regulação da via de sinalização da insulina.[147] Em adipócitos da linhagem 3T3-L1, o ácido oleico não alterou a expressão de GLUT4, transportador importante na captação de glicose para o meio intracelular, quando comparado aos ácidos esteárico e eicopentaenoico.[138] Entretanto, em animais submetidos a uma dieta com ração hiperlipídica, a substituição de ácido graxo saturado por monoinsaturado melhora a ação da insulina e, portanto, a glicemia pós-prandial.[98] Além disso, o consumo de dieta rica em ácido oleico por indivíduos resistentes à insulina, durante 28 dias, resultou em menor concentração pós-prandial de ácidos graxos livres, glicose e leptina de jejum em comparação à dieta rica em ácidos graxos saturados.[148] Esse resultado pode ser atribuído ao papel do ácido oleico em inibir a expressão de resistina, proteína diretamente relacionada ao desenvolvimento de resistência à ação da insulina, e induzir a expressão de adiponectina, associada à melhora da sensibilidade à ação da insulina.[146]

A representação esquemática da ação do ácido oleico sobre algumas vias de sinalização está apresentada na Figura 11.1.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora, durante muitos anos, os ácidos graxos monoinsaturados tenham sido considerados neutros sob o ponto de vista cardiovascular, demonstrou-se, posteriormente, sua ação benéfica em estudos clínicos e epidemiológicos com o uso da dieta do Mediterrâneo, na qual o ácido oleico é predominante.

A elucidação da ação desses ácidos graxos sobre fatores de transcrição gênica vem possibilitando o entendimento de sua ação com vias de sinalização associadas direta ou indiretamente ao desenvolvimento da doença cardiovascular. Dessa forma, a nutrigenômica como ferramenta de investigação vem confirmando a importância do consumo do ácido oleico no contexto de uma dieta com quantidades adequadas de calorias e de lipídios, conforme recomendações das diretrizes nacionais e internacionais.

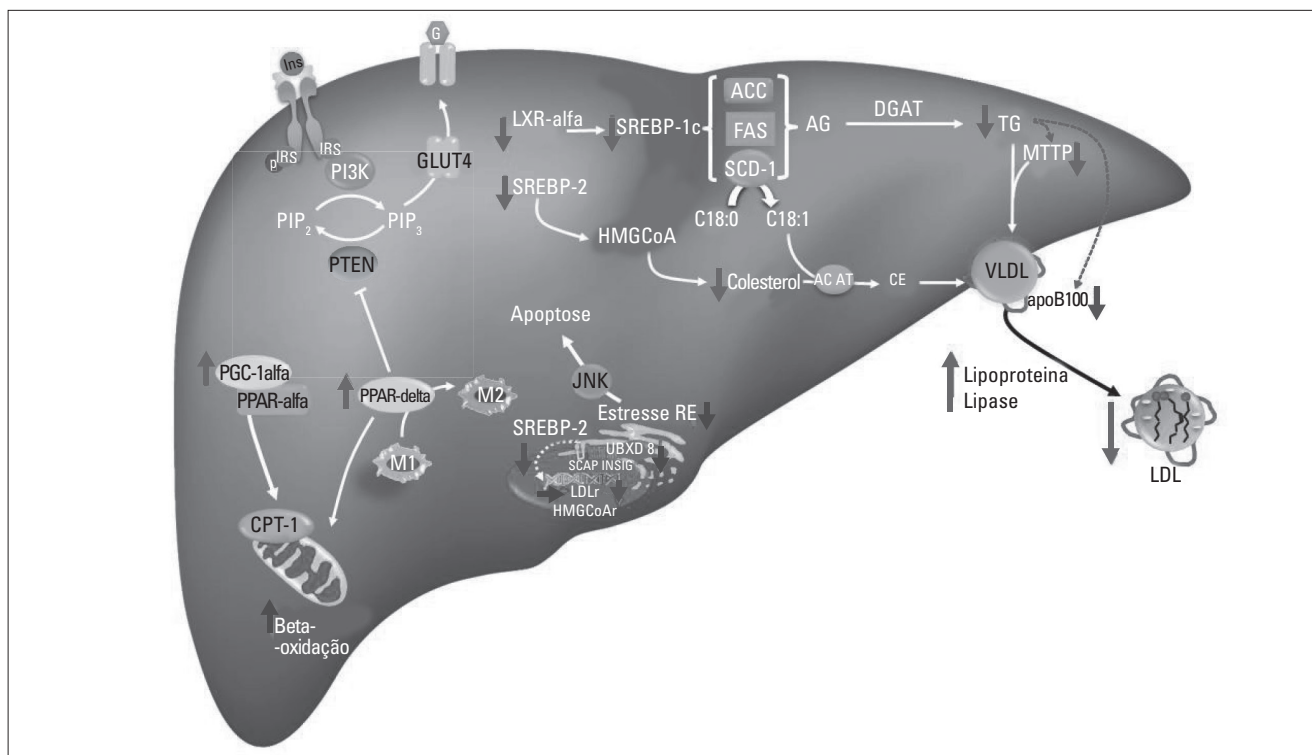



Figura 11.1 Ação do ácido oleico sobre vias de sinalização intracelulares. ACAT: acil CoA:colesterol aciltransferase; ACC: acetil CoA carboxilase; apo: apolipoproteína; AG: ácido graxo; CE: colesterol esterificado; CPT-1: carnitina palmitoil transferase-1; DGAT: diacilglicerol aciltransferase; FAS: ácido graxo sintase; GLUT: transportador de glicose; HMGCoAr: enzima HMG CoA redutase; INSIG: gene induzido por insulina; IRS: substrato do receptor de insulina; JNK: c-Jun amino-terminal quinase; LDLr: receptor de LDL; LXR-alfa: receptor nuclear X hepático alfa; M1 e 2: macrófagos 1 e 2; MTTP: proteína de transferência microssomal de triacilgliceróis; PGC-1alfa: coativador 1alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma; PI3K: fosfatidil inositol-3-quinase; PPAR: receptores ativados por proliferadores de peroxissoma; PTEN: fosfatase homóloga à tensina; RE: retículo endoplasmático; SCAP: proteína ativadora da clivagem de SREBP; SCD-1: estearoil CoA dessaturase; SREBP: proteína ligadora ao elemento responsivo a esteróis; TG: triglicérides. **Fonte:** adaptada de Afonso et al.[149], Arner e Langin[150], Abumrad e Davidson[151], Lottenberg et al.[152], Iqbal e Hussain[153].

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sampath H, Ntambi JM. The fate and intermediary metabolism of stearic acid. Lipids. 2005;40(12):1187-91. Review.
2. Ntambi JM. Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. J Lipid Res. 1999;40(9):1549-58. Review.
3. Keys A. Coronary heart disease in seven countries. Circulation. 1970;41:S1-S211.
4. Jakobsen MU, O'Reilly EJ, Heitmann BL et al. Major types of dietary fat and risk of coronary heart disease: a pooled analysis of 11 cohort studies. Am J Clin Nutr. 2009;89(5):1425-32.
5. Chowdhury R, Warnakula S, Kunutsor S et al. Association of dietary, circulating, and supplement fatty acids with coronary risk: a systematic review and meta-analysis. Ann Intern Med. 2014;160(6):398-406.
6. Skeaff CM, Miller J. Dietary fat and coronary heart disease: summary of evidence from prospective cohort and randomised controlled trials. Ann Nutr Metab. 2009;55(1-3):173-201.
7. Pietinen P, Ascherio A, Korhonen P et al. Intake of fatty acids and risk of coronary heart disease in a cohort of Finnishmen. The Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study. Am J Epidemiol. 1997;145(10):876-87.
8. Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE et al. Dietary saturated fat and their food sources in relation to the risk of coronary heart disease in women. Am J Clin Nutr. 1999;70:1001-08.
9. Artaud-Wild SM, Connor SL, Sexton G et al. Differences in coronary mortality can be explained by differences in cholesterol and saturated fat intakes in 40 countries but not in France and Finland: a paradox. Circulation. 1993;88(6):2771-79.
10. Schwingshackl L, Hoffmann G. Monounsaturated fatty acids, olive oil and health status: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. Lipids Health Dis. 2014;1(13):154.
11. Hoevenaar-Blom MP, Nooyens AC, Kromhout D et al. Mediterranean style diet and 12-year incidence of cardiovascular diseases: the Epic-NL cohort study. PLoS One. 2012;7(9):e45458.
12. Beulens JW, Monninkhof EM, Verschuren WM, van der Schouw YT, Smit J et al. Cohort profile: The Epic-NL study. Int J Epidemiol. 2009;39:1170-78.
13. Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J et al. Predimed Study Investigators. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. N Engl J Med. 2013;368(14):1279-90.
14. Kris-Etherton PM. AHA science advisory. Monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease. American Heart Association. Nutrition Committee. Circulation. 1999;100(11):1253-58.
15. Santos RD, Gagliardi AC, Xavier HT et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. First guidelines on fat consumption and cardiovascular health. Arq Bras Cardiol. 2013;100(1 Suppl 3):1-40.
16. Keys A, Anderson JT, Grande F. Prediction of serum-cholesterol responses of man to changes in fats in the diet. Lancet. 1957;2:959-66.

17. Reaven PD, Grasse BJ, Tribble DL. Effect of linoleate-enriched and oleate-enriched diets in combination with alpha-tocopherol on the susceptibility of LDL and LDL subfractions to oxidative modification in humans. Arterioscler Thromb. 1994;14:557-66.
18. Mensink RP, Zock PL, Kester AD, Katan MB. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. Am J Clin Nutr. 2003;77(5):1146-55.
19. Rumsey SC, Galeano NF, Lipschitz B et al. Oleate and other long chain fatty acids stimulate low density lipoprotein receptor activity by enhancing acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase activity and altering intracellular regulatory cholesterol pools in cultured cells. J Biol Chem. 1995;270(17):10008-16.
20. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. J Clin Invest. 2002;109(9):1125-31. Review.
21. Goldstein JL, Rawson RB, Brown MS. Mutant mammalian cells as tools to delineate the sterol regulatory element-binding protein pathway for feedback regulation of lipid synthesis. Arch Biochem Biophys. 2002;397(2):139-48.
22. Song BL, Javitt NB, DeBose-Boyd RA. Insig-mediated degradation of HMG CoA reductase stimulated by lanosterol, an intermediate in the synthesis of cholesterol. Cell Metab. 2005;1:179-89.
23. Lee JN, Zhang X, Feramisco JD et al. Unsaturated fatty acids inhibit proteasomal degradation of Insig-1 at a post-ubiquitination step. J Biol Chem. 2008;283(48):33772-83.
24. Kim H, Zhang H, Meng D et al. UAS domain of Ubxd8 and FAF1 polymerizes upon interaction with long-chain unsaturated fatty acids. J Lipid Res. 2013;54(8):2144-52.
25. Jelinek D, Castillo JJ, Richardson LM et al. The Niemann-Pick C1 gene is down-regulated in livers of C57BL/6J mice by dietary fatty acids, but not dietary cholesterol, through feedback inhibition of the SREBP pathway. J Nutr. 2012;142(11):1935-42.
26. Thewke DP, Panini SR, Sinensky M. Oleate potentiates oxysterol inhibition of transcription from sterol regulatory element-1-regulated promoters and maturation of sterol regulatory element-binding proteins. J Biol Chem. 1998;273(33):21402-07.
27. Li S, Brown MS, Goldstein JL. Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis. Proc Natl Acad Sci USA. 2010;107(8):3441-6.
28. DeBose-Boyd RA, Ou J, Goldstein JL et al. Expression of sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c) mRNA in rat hepatoma cells requires endogenous LXR ligands. Proc Natl Acad Sci USA. 2001;98(4):1477-82.
29. Edwards PA, Tabor D, Kast HR et al. Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. Biochim Biophys Acta. 2000;1529(1-3): 103-13. Review.
30. Hussein O, Grosovski M, Lasri E et al. Monounsaturated fat decreases hepatic lipid content in non-alcoholic fatty liver disease in rats. World J Gastroenterol. 2007;13(3):361-68.
31. Ou J, Tu H, Shan B et al. Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR. Proc Natl Acad Sci USA. 2001;98(11):6027-32.
32. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ et al. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. J Clin Invest. 2005;115:1343-51.
33. Lin J, Yang R, Tarr PT et al. Hyperlipidemic effects of dietary saturated fats mediated through PGC-1 coactivation of SREBP. Cell. 2005;120:261-73.
34. Morari J, Torsoni AS, Anhê GF et al. The role of proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha in the fatty-acid-dependent transcriptional control of interleukin-10 in hepatic cells of rodents. Metabolism. 2010;59(2):215-23.
35. Puigserver P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. Endocr Rev. 2003;24(1):78-90. Review.
36. Assy N, Nassar F, Nasser G et al. Olive oil consumption and non-alcoholic fatty liver disease. World J Gastroenterol. 2009;15(15):1809-15.
37. Tailleux A, Wouters K, Staels B. Roles of PPARs in NAFLD: potential therapeutic targets. Biochim Biophys Acta. 2012;1821(5):809-18.
38. Wu HT, Chen W, Cheng KC et al. Oleic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor δ to compensate insulin resistance in steatotic cells. J Nutr Biochem. 2012;23(10):1264-70.
39. Peyrou M, Bourgoin L, Foti M. PTEN in liver diseases and cancer. World J Gastroenterol. 2010;16(37):4627-33.
40. Wang YX, Lee CH, Tiep S et al. Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. Cell. 2003;113(2):159-70.
41. Rector RS, Thyfault JP, Wei Y et al. Non-alcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: an update. World J Gastroenterol. 2008;14(2):185-92.
42. Sato K, Arai H, Mizuno A et al. Dietary palatinose and oleic acid ameliorate disorders of glucose and lipid metabolism in Zucker fatty rats. J Nutr. 2007;137:1908-15.
43. Sampath H, Miyazaki M, Dobrzyn A et al. Stearoyl-CoA desaturase-1 mediates the prolipogenic effects of dietary saturated fat. J Biol Chem. 2007;282:2483–93.
44. Guillou H, Zadravec D, Martin PG et al. The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: insights from transgenic mice. Prog Lipid Res. 2010;49(2):186-99.
45. Man WC, Miyazaki M, Chu K et al. Colocalization of SCD1 and DGAT2: implying preference for endogenous monounsaturated fatty acids in triglyceride synthesis. J Lipid Res. 2006;47(9):1928-39.
46. Welch VA, Borlak JT. Absorption and transport of dietary lipid. In: Chow CK (ed.). Fatty acids in food and their health implications. 3.ed. Boca Raton: CRC Press; 2008.
47. Moberly JB, Cole TG, Alpers DH, Schonfeld G. Oleic acid stimulation of apolipoprotein B secretion from HepG2 and Caco-2 cells occurs post-transcriptionally. Biochim Biophys Acta. 1990;1042(1):70-80.
48. Festi D, Colecchia A, Sacco T et al. Hepatic steatosis in obese patients: clinical aspects and prognostic significance. Obes. Rev. 2004;5:27-42.
49. Malhi H, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress in liver disease. J Hepatol. 2011;54(4):795-809.
50. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2007;8:519-29.
51. Wei Y, Wang D, Topczewski F, Pagliassotti MJ. Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2006;291(2):E275-81.
52. Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A et al. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNFalpha expression via a lysosomal pathway. Hepatology 2004;40:185-94.

53. Feldstein AE, Werneburg NW, Li Z et al. Bax inhibition protects against free fatty acid-induced lysosomal permeabilization. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2006;290:G1339-46.
54. Malhi H, Bronk SF, Werneburg NW et al. Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis. J Biol Chem. 2006;28:281(17):12093-101.
55. Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M et al. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. J Mol Endocrinol. 2006;36:485-501.
56. Niot I, Poirier H, Tran TT et al. Intestinal absorption of long-chain fatty acids: evidence and uncertainties. Prog Lipid Res. 2009;48(2):101-15.
57. Kampf JP, Cupp D, Kleinfeld AM. Different mechanisms of free fatty acid flip–flop and dissociation revealed by temperature and molecular species dependence of transport across lipid vesicles. J Biol Chem. 2006;281:21566-74.
58. Brunaldi K, Miranda MA, Abdulkader F et al. Fatty acid flip-flop and proton transport determined by short-circuit current in planar bilayers. J. Lipid Res. 2005;46:245-51.
59. Murota K, Storch J. Uptake of micellar long-chain fatty acid and *sn*-2-monoacylglycerol into human intestinal caco-2 cells exhibits characteristics of protein-mediated transport. J Nutr. 2005;135(7):1626-30.
60. Chen M, Yang Y, Braunstein E et al. Gut expression and regulation of FAT/CD36: possible role in fatty acid transport in rat enterocytes. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2001;281(5):E916-23.
61. Stahl A, Hirsch DJ, Gimeno RE et al. Identification of the major intestinal fatty acid transport protein. Mol Cell. 1999;4(3):299-308.
62. Nassir F, Wilson B, Han X et al. CD36 is important for fatty acid and cholesterol uptake by the proximal but not distal intestine. J Biol Chem. 2007;282(27):19493-501.
63. Milger K, Herrmann T, Becker C et al. Cellular uptake of fatty acids driven by the ER-localized acyl-CoA synthetase FATP4. J Cell Sci. 2006;119:4678-88.
64. Tso P, Karlstad MD, Bistrian BR et al. Intestinal digestion, absorption, and transport of structured triglycerides and cholesterol in rats. Am J Physiol 1995;268:G568–577.
65. Siddiqi S, Sheth A, Patel F, Barnes M, Mansbach CM 2nd. Intestinal caveolin-1 is important for dietary fatty acid absorption. Biochim Biophys Acta. 2013;1831(8):1311-21.
66. Wu X, Zhou M, Huang LS et al. Demonstration of a physical interaction between microsomal triglyceride transfer protein and apolipoprotein B during the assembly of ApoB-containing lipoproteins. J Biol Chem. 1996;271:10277–81.
67. Wang S, McLeod RS, Gordon DA et al. The microsomal triglyceride transfer protein facilitates assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins and decreases cotranslational degradation of apolipoprotein B in transfected COS-7 cells. J Biol Chem. 1996;271(24):14124-33.
68. van Greevenbroek MM, van Meer G, Erkelens DW et al. Effects of saturated, mono-, and polyunsaturated fatty acids on the secretion of apo B containing lipoproteins by Caco-2 cells. Atherosclerosis. 1996;121(1):139-50.
69. van Greevenbroek MM, Robertus-Teunissen MG, Erkelens DW et al. Participation of the microsomal triglyceride transfer protein in lipoprotein assembly in Caco-2 cells: interaction with saturated and unsaturated dietary fatty acids. J Lipid Res. 1998;39(1):173-85.
70. Lee RG, Willingham MC, Davis MA et al. Differential expression of ACAT1 and ACAT2 among cells within liver, intestine, kidney, and adrenal of nonhuman primates. J Lipid Res. 2000;41:1991-2001.
71. Yu L, Hammer RE, Li-Hawkins J et al. Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. Proc Natl Acad Sci USA. 2002;99(25):16237-42.
72. Alvaro A, Rosales R, Masana L et al. Polyunsaturated fatty acids down-regulate in vitro expression of the key intestinal cholesterol absorption protein NPC1L1: no effect of monounsaturated nor saturated fatty acids. J Nutr Biochem. 2010;21(6):518-25.
73. Murthy S, Born E, Mathur SN et al. Liver-X-receptor-mediated increase in ATP-binding cassette transporter A1 expression is attenuated by fatty acids in CaCo-2 cells: effect on cholesterol efflux to high-density lipoprotein Biochem J. 2004;377:545-52.
74. Seo T, Oelkers PM, Giattina MR et al. Differential modulation of ACAT1 and ACAT2 transcription and activity by long chain free fatty acids in cultured cells. Biochemistry. 2001;40(15):4756-62.
75. Olivecrona T, Bergö M, Hultin M, Olivecrona G. Nutritional regulation of lipoprotein lipase. Can J Cardiol. 1995;11 Suppl G:73G-78G.
76. Dijk W, Kersten S. Regulation of lipoprotein lipase by Angptl4. Trends Endocrinol Metab. 2014;25(3):146-55.
77. Robal T, Larsson M, Martin M, Olivecrona G, Lookene A. Fatty acids bind tightly to the N-terminal domain o angiopoietin-like protein 4 and modulate its interaction with lipoprotein lipase. J Biol Chem. 2012;287(35):29739-52.
78. Gurr MI, Frayn KN, Harwood JL. Lipid transport. In: Gurr MI, Frayn KN, Harwood JL (eds.). Lipid biochemistry. 5.ed. Oxford: Blackwell Science; 2002.
79. Woltman T, Castellanos D, Reidelberger R. Role of cholecystokinin in the anorexia produced by duodenal delivery of oleic acid in rats. Am J Physiol. 1995;269:R1420-33.
80. Lal S, McLaughlin J, Barlow J et al. Cholecystokinin pathways modulate sensations induced by gastric distension in humans. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2004;287:G72-G79.
81. Raybould HE. Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut. I. Sensing of lipid by the intestinal mucosa. Am J Physiol. 1999;277(4 Pt 1):G751-5. Review.
82. Raybould HE, Lloyd KC. Integration of postprandial function in the proximal gastrointestinal tract. Role of CCK and sensory pathways. Ann N Y Acad Sci. 1994;713:143-56.
83. Sykaras AG, Demenis C, Case RM et al. Duodenal enteroendocrine I-cells contain mRNA transcripts encoding key endocannabinoid and fatty acid receptors. PLoS One.2012; 7(8):e42373.
84. Liou AP, Lu X, Sei Y et al. The G-protein-coupled receptor GPR40 directly mediates long-chain fatty acid-induced secretion of cholecystokinin. Gastroenterology. 2011;140(3):903-12.
85. Edfalk S, Steneberg P, Edlund H. Gpr40 Is expressed in enteroendocrine cells and mediates free fatty acid stimulation of incretin secretion. Diabetes. 2008;57:2280-87.
86. Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T et al. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. Nat Med. 2005;11:90-94.
87. Schwartz GJ. Gut fat sensing in the negative feedback control of energy balance – recent advances. Physiol Behav. 2011;104,621-23.
88. Drucker DJ. The biology of incretin hormones. Cell Metab. 2006;3(3):153-65. Review.
89. Eissele R, Goke R, Willemer S et al. Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. Eur J Clin Invest. 1992;22:283-91.

90. Iakoubov R, Izzo A, Yeung A et al. Protein kinase Cζ is required for oleic acid-induced secretion of glucagon-like peptide-1 by intestinal endocrine L cells. Endocrinology. 2007;148:1089-98.
91. Rocca AA, Lagreca J, Kalitsky J et al. Monounsaturated fatty acid diets improve glycemic tolerance through increased secretion of glucagon-like peptide-1. Endocrinology. 2001;142:1148-55.
92. Thomsen C, Storm H, Holst JJ et al. Differential effects of saturated and monounsaturated fats on postprandial lipemia and glucagon-like peptide 1 responses in patients with type 2 diabetes. Am J Clin Nutr. 2003;77(3):605-11.
93. Thomsen C, Rasmussen O, Lousen T et al. Differential effects of saturated and monounsaturated fatty acids on postprandial lipemia and incretin responses in healthy subjects. Am J Clin Nutr. 1999;69(6):1135-43.
94. Piomelli D. A fatty gut feeling. Trends Endocrinol Metab. 2013;24(7):332-41.
95. Randich A, Tyler WJ, Cox JE, Meller ST, Kelm GR, Bharaj SS. Responses of celiac and cervical vagal afferents to infusions of lipids in the jejunum or ileum of the rat. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2000;278(1):R34-43.
96. Zittel TT, De Giorgio R, Sternini C et al. Fos protein expression in the nucleus of the solitary tract in response to intestinal nutrients in awake rats. Brain Res. 1994;663(2):266-70.
97. de Souza CT, Araujo EP, Bordin S et al. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. Endocrinology. 2005;146(10):4192-99.
98. Cintra DE, Ropelle ER, Moraes JC et al. Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. PLoS One. 2012;7(1):e30571.
99. Oh DY, Talukdar S, Bae EJ et al. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. Cell. 2010;142(5):687-98
100. Covasa M, Ritter RC. Reduced sensitivity to the satiation effect of intestinal oleate in rats adapted to high-fat diet. Am J Physiol. 277 (Regulatory Integrative Comp Physiol). 1999;46:R279-85.
101. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S et al. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. Nature. 2006;444(7122):1022-23.
102. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature. 2006;444(7122):1027-31.
103. Backhed F, Ding H, Wang T et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. Proc Natl Acad Sci USA. 2004;101:15718-23.
104. Serino M, Luche E, Gres S et al. Metabolic adaptation to a high-fat diet is associated with a change in the gut microbiota. Gut. 2012;61:543-53.
105. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet–induced obesity and diabetes in mice. Diabetes. 2008;57:1470-81.
106. Mujico Jr, Baccan GC, Gheorghe A et al. Changes in gut microbiota due to supplemented fatty acids in diet-induced obese mice. Br J Nutr. 2013;110(4):711-20.
107. de Wit N, Derrien M, Bosch-Vermeulen H et al. Saturated fat stimulates obesity and hepatic steatosis and affects gut microbiota composition by an enhanced overflow of dietary fat to the distal intestine. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2012;303:G589-99.
108. Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. Nat Immunol. 2011;12(3):204-12.
109. Rocha VZ, Libby P. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. Nat Rev Cardiol. 2009;6(6):399-409.
110. Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. N Engl J Med. 1999;340(2):115-26.
111. Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr et al. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. Arterioscler Thromb. 1993;13(2):197-204.
112. Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. J Clin Invest. 1991;88(6):1785-92.
113. Fuhrman B, Partoush A, Volkova N et al. Ox-LDL induces monocyte-to-macrophage differentiation in vivo: Possible role for the macrophage colony stimulating factor receptor (MCSF-R). Atherosclerosis. 2008;196(2):598-607.
114. Mata P, Alonso R, Lopez-Farre A et al. Effect of dietary fat saturation on LDL oxidation and monocyte adhesion to human endothelial cells in vitro. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1996;16(11):1347-55.
115. Tsimikas S, Philis-Tsimikas A, Alexopoulos S et al. LDL isolated from Greek subjects on a typical diet or from American subjects on an oleate-supplemented diet induces less monocyte chemotaxis and adhesion when exposed to oxidative stress. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1999;19(1):122-30.
116. Lee C, Barnett J, Reaven PD. Liposomes enriched in oleic acid are less susceptible to oxidation and have less proinflammatory activity when exposed to oxidizing conditions. J Lipid Res. 1998;39(6):1239-47.
117. Carluccio MA, Massaro M, Bonfrate C et al. Oleic acid inhibits endothelial activation: a direct vascular antiatherogenic mechanism of a nutritional component in the mediterranean diet. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1999;19(2):220-28.
118. Massaro M, Carluccio MA, Paolicchi A et al. Mechanisms for reduction of endothelial activation by oleate: inhibition of nuclear factor-kappaB through antioxidant effects. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2002;67(2-3):175-81.
119. Finn AV, Kolodgie FD, Virmani R. Correlation between carotid intimal/medial thickness and atherosclerosis: a point of view from pathology. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010;30(2):177-81.
120. Gao D, Pararasa C, Dunston CR et al. Palmitate promotes monocyte atherogenicity via de novo ceramide synthesis. Free Radic Biol Med. 2012; 53(4):796-806.
121. Ishiyama J, Taguchi R, Akasaka Y et al. Unsaturated FAs prevent palmitate-induced LOX-1 induction via inhibition of ER stress in macrophages. J Lipid Res. 2011;52(2):299-307.
122. Ishiyama J, Taguchi R, Yamamoto A et al. Palmitic acid enhances lectin-like oxidized LDL receptor (LOX-1) expression and promotes uptake of oxidized LDL in macrophage cells. Atherosclerosis. 2010;209(1):118-24.
123. Tall AR. Cholesterol efflux pathways and other potential mechanisms involved in the athero-protective effect of high density lipoproteins. J Intern Med. 2008;263(3):256-73.
124. Laffitte BA, Repa JJ, Joseph SB, Wilpitz DC, Kast HR, Mangelsdorf DJ et al. LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. Proc Natl Acad Sci USA. 2001;16;98(2):507-12.
125. Uehara Y, Miura S, von Eckardstein A et al. Unsaturated fatty acids suppress the expression of the ATP-binding cassette transporter G1 (ABCG1) and ABCA1 genes via an LXR/RXR responsive element. Atherosclerosis. 2007; 191(1): 11-21.

126. Uehara Y, Engel T, Li Z et al. Polyunsaturated fatty acids and acetoacetate down-regulate the expression of the ATP-binding cassette transporter A1. Diabetes. 2002;51(10):2922-8.
127. Wang Y, Oram JF. Unsaturated fatty acids phosphorylate and destabilize ABCA1 through a protein kinase C delta pathway. J Lipid Res. 2007;48(5):1062-68.
128. Wang Y, Oram JF. Unsaturated fatty acids inhibit cholesterol efflux from macrophages by increasing degradation of ATP-binding cassette transporter A1. J Biol Chem. 2002;277(7):5692-97.
129. Sun Y, Ishibashi M, Seimon T et al. Free cholesterol accumulation in macrophage membranes activates Toll-like receptors and p38 mitogen-activated protein kinase and induces cathepsin K. Circ Res. 2009;104(4):455-65.
130. Feng B, Yao PM, Li Y et al. The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. Nat Cell Biol. 2003;5(9):781-92.
131. Duewell P, Kono H, Rayner KJ et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. Nature. 2010;464:1357-61.
132. Rajamäki K, Lappalainen J, Oörni K et al. Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation. PLoS One. 2010;5:e11765
133. L'homme L, Esser N, Riva L, Scheen A, Paquot N, Piette J et al. Unsaturated fatty acids prevent activation of NLRP3 inflammasome in human monocytes/macrophages. J Lipid Res. 2013;54:2998-3008.
134. Tabas I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. Nat Rev Immunol. 2010;10(1):36-46.
135. Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MI et al. The adipose tissue as a regulatory center of the metabolismo. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2006;50(2):216-29. Review.
136. Drolet R, Richard C, Sniderman AD et al. Hypertrophy and hyperplasia of abdominal adipose tissues in women. Int J Obes (Lond). 2008;32:283-91.
137. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. J Clin Invest. 2003;112(12):1796-808.
138. Manickam E, Sinclair AJ, Cameron-Smith D. Suppressive actions of eicosapentaenoic acid on lipid droplet formation in 3T3-L1 adipocytes. Lipids Health Dis. 2010;9:57.
139. Sessler AM, Kaur N, Palta JP et al. Regulation of stearoyl-CoA desaturase 1 mRNA stability by polyunsaturated fatty acids in 3T3-L1 adipocytes. J Biol Chem. 1996;271(47):29854-58.
140. Charrière G, Cousin B, Arnaud E et al. Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity. J Biol Chem. 2003;278(11):9850-55.
141. Lin Y, Lee H, Berg AH, Lisanti MP, Shapiro L, Scherer PE. The lipopolysaccharide-activated toll-like receptor (TLR)-4 induces synthesis of the closely related receptor TLR-2 in adipocytes. J Biol Chem. 2000;275(32):24255-63.
142. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. J Clin Invest. 2007;117(1):175-84.
143. Camell C, Smith CW. Dietary oleic acid increases m2 macrophages in the mesenteric adipose tissue. PLoS One. 2013;8(9):e75147.
144. van Dijk SJ, Feskens EJM, Bos MB et al. A saturated fatty acid–rich diet induces an obesity-linked proinflammatory gene expression profile in adipose tissue of subjects at risk of metabolic syndrome. Am J Clin Nutr 2009;90:1656–64.
145. Enns JE, Hanke D, Park A et al. Diets high in monounsaturated and polyunsaturated fatty acids decrease fatty acid synthase protein levels in adipose tissue but do not alter other markers of adipose function and inflammation in diet-induced obese rats. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2014;90(2-3):77-84.
146. Granados N, Amengual J, Ribot J et al. Distinct effects of oleic acid and its trans-isomer elaidic acid on the expression of myokines and adipokines in cell models. Br J Nutr. 2011;105(8):1226-34.
147. Coelho M, Oliveira T, Fernandes R. Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. Arch Med Sci. 2013;9(2):191-200.
148. Paniagua JA, Gallego de la Sacristana A, Romero I et al. Monounsaturated fat-rich diet prevents central body fat distribution and decreases postprandial adiponectin expression induced by a carbohydrate-rich diet in insulin-resistant subjects. Diabetes Care. 2007;30(7):1717-23.
149. Afonso S, Castilho G, Lavrador MS et al. The impact of dietary fatty acids on macrophage cholesterol homeostasis. J Nutr Biochem. 2014;25(2):95-103.
150. Arner P, Langin D. Lipolysis in lipid turnover, cancer cachexia, and obesity-induced insulin resistance. Trends Endocrinol Metab. 2014;25(5):255-62.
151. Abumrad NA, Davidson NO. Role of the gut in lipid homeostasis. Physiol Rev. 2012;92(3):1061-85.
152. Lottenberg AM, Afonso S, Lavrador MS et al. The role of dietary fatty acids in the pathology of metabolic syndrome. J Nutr Biochem. 2012;23(9):1027-40.
153. Iqbal J, Hussain MM. Intestinal lipid absorption. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009;296(6):E1183-94.

Vitamina A | 12

Sergio Alberto Rupp de Paiva
Renata Aparecida Candido da Silva
Paula Shmidt Azevedo Gaiolla
Leonardo Antonio Mamede Zornoff

INTRODUÇÃO

Vitamina A é um termo que se refere a um subgrupo de retinoides naturais com atividade biológica do retinol todo-*trans*. Os principais retinoides são retinol (álcool), retinal (aldeído) e ácido retinoico (AR) (ácido). A vitamina A exerce papel fundamental em múltiplos processos que envolvem diferenciação celular e desenvolvimento tecidual, como cicatrização, epitelização, reprodução, embriogênese e imunidade. O retinol pode ser oxidado a retinal e, nesta forma, desempenha todas as atividades biológicas do retinol. O retinal, ao ser novamente oxidado, transforma-se em AR, e essa forma de vitamina A não apresenta atividade na visão e no sistema reprodutivo.[1] A diversidade de ação da vitamina A se deve, em grande parte, ao AR, que é considerado hormônio de ação pleiotrópica. As atividades biológicas da vitamina A são realizadas por meio de um sistema de sinalização complexo do qual participam os receptores nucleares, incluindo o receptor de AR (RAR) e o receptor X de retinoides (RXR).

Uma forma de se obter a vitamina A é por meio da ingestão de alimentos que contenham vitamina A pré-formada ou ésteres retinílicos (ER). Outra forma é por meio da ingestão de carotenoides. Alguns desses compostos são chamados de provitamina A, em razão de darem origem a retinoides ao serem clivados.[2]

Para que o composto apresente ação de vitamina A, é necessário que possua em sua estrutura ao menos um anel beta-ionona (trimetil ciclo-hexano conjugado) e uma cadeia lateral poliênica ligada. Existem mais de 600 carotenoides na natureza e apenas 50 apresentam atividade de vitamina A. Os carotenoides mais conhecidos com essa atividade são o alfa e o betacaroteno e a beta-criptoxantina.[2]

METABOLISMO

Na fase de digestão, os ER e os carotenoides são liberados de suas combinações proteicas por meio da ação de enzimas proteolíticas do sistema digestivo. Como vitamina A e carotenoides são lipossolúveis, os lipídios oriundos da alimentação atuam como veículo para o transporte de ambos no lúmen intestinal. Esses compostos participam das micelas, sendo os ER hidrolisados pelas esterases pancreáticas e por esterases próprias da membrana apical do intestino delgado, o que acarreta a liberação do retinol. O retinol livre é absorvido pelas células da mucosa intestinal, com o auxílio da bile.[3]

O transporte intracelular de vitamina A é mediado por proteínas transportadoras. A proteína ligadora do retinol (RBP, *retinol-binding protein*) celular tipo 2 funciona como reservatório do retinol absorvido e o apresenta para as enzimas esterificantes. A reesterificação do retinol com ácidos graxos de cadeia longa ocorre nas células da mucosa intestinal. A principal enzima envolvida na esterificação intestinal do retinol ligado à RBP celular é a lecitina retinol aciltransferase (LRAT). O retinol livre (disperso no citosol) pode ser esterificado tanto pela enzima acil coenzima A retinol aciltransferase (ARAT) como pela LRAT.[4] Os complexos formados (ER com ácidos graxos de cadeia longa, principalmente os ácidos graxos palmítico ou esteárico) são transportados por quilomícrons (Qm) na circulação linfática e, posteriormente, alcançam a circulação sanguínea via ducto torácico.[5]

Outra fonte de retinol é a conversão de carotenoides. O betacaroteno é convertido em retinol na mucosa intestinal, processo que necessita de duas enzimas. Uma delas é a betacaroteno 15,15'-mono-oxigenase (BCMO1), que cliva centralmente o betacaroteno e, a partir dessa reação, resultam duas moléculas de retinaldeído. A outra enzima

é a retinaldeído redutase, que catalisa a redução do retinal em retinol. Além dessa forma de conversão, os carotenoides podem seguir outras vias, como passar intactos para a circulação linfática e serem metabolizados em uma forma inativa ou ficar retidos até o descamamento celular no intestino.[2]

Outros carotenoides podem, também, ser convertidos em vitamina A por meio da ação de duas enzimas: a BCMO1, que promove a clivagem central, gerando retinoides, e a betacaroteno-9',10'-mono-oxigenase (BCMO2), que promove clivagem excêntrica, gerando apocarotenoides de cadeia longa. A verificação de que as oxigenases são fundamentais para a homeostase dos retinoides foi realizada em animais *knockout* para os genes *Bcmo1* e *Bcmo2* e com a administração de betacaroteno como fonte de vitamina A. Os animais com duplo *knockout* apresentaram acúmulo de betacaroteno e deficiência de vitamina A.[6]

A conversão do betacaroteno em retinol é variável e, às vezes, muito baixa.[7] Em estudos populacionais, 27 a 45% dos indivíduos foram classificados como conversores deficientes do betacaroteno em retinol. Esses indivíduos apresentavam apenas 9% de capacidade de formar vitamina A a partir do betacaroteno. Essa ampla diferença interindividual pode ser causada por redução da atividade enzimática como consequência de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) no gene *BCMO1*.[8] Os SNP mais estudados no gene *BCMO1* são o R267S (rs12934922), que se refere à troca de uma adenina por uma timina na posição 801 do gene, resultando na codificação de uma serina em vez de uma arginina no códon 267, e o A379V (rs7501331), com troca de uma citosina por uma timina na posição 1136 do gene e consequente troca de uma arginina por uma valina no códon 379. A combinação das variantes R267S + A379V reduz a atividade catalítica da BCMO1 *in vitro* em 57%.[9] Ainda, a mutação T170M no gene *BCMO1* causa grande diminuição da atividade enzimática *in vitro*, tendo-se observado a presença de hipercarotenemia e hipovitaminose A em indivíduo carreador do alelo variante em homozigose. Entretanto, a frequência dessa mutação é muito baixa e não explica a alta frequência de fenótipos conversores deficientes observados na população humana.[10]

A quantidade de ER nos Qm varia de acordo com a quantidade de vitamina A na alimentação, podendo ser inexistente se a refeição for livre dessa vitamina ou conter até vários miligramas, por exemplo, em refeição contendo fígado bovino ou por meio da ingestão de suplementos de vitamina A. O transporte de ER pelos Qm depende do metabolismo do próprio Qm, com o pico de concentração ocorrendo de duas a seis horas após a ingestão. Os Qm são metabolizados nos tecidos em que há grande atividade da enzima lipase de lipoproteína. A captação de ER por tecidos extra-hepáticos corresponde a 20 a 40% da vitamina A da alimentação. Dentro dos Qm, também há retinol não esterificado, que corresponde de 5 a 10% da vitamina A total. Essa forma possibilita maior rapidez na oferta da vitamina A aos tecidos. O ER no Qm e o retinol não esterificado podem ser vias de transporte importantes em situações de deficiência de vitamina A.[5,11]

Captação hepática de quilomícrons

As células do parênquima hepático são responsáveis pela captação dos Qm remanescentes e dos ER a eles ligados. Nessas células, ocorre hidrólise dos ésteres e o retinol é rapidamente transportado às células estreladas perissinusoidais, para estoque, pela RBP celular. Cerca de 90% das reservas corporais de vitamina A são armazenadas nas células estreladas hepáticas, sob a forma de ER.[12] Quando necessário, o retinol é mobilizado a partir das células estreladas (os ER sofrem nova hidrólise) e enviado diretamente à circulação sanguínea, ligado à RBP. A hidrólise dos ER, no fígado, é mediada pela enzima retinil éster hidrolase (REH). A secreção do complexo RBP-retinol do fígado para o plasma ocorre por meio do complexo de Golgi, e a secreção das vesículas e microtúbulos derivados do aparelho de Golgi não reflete a totalidade da síntese proteica hepática da RBP.[13]

Transporte

A vitamina A é transportada do fígado aos órgãos na forma de retinol ligado à RBP. Essa proteína é também chamada de RBP4, que é a designação de seu gene. A RBP circula no sangue ligada à transtirretina (TTR) e ao retinol, formando um sistema de transporte que, em condições normais, apresenta a relação molar de 1:1:1. A liberação do retinol para a circulação sanguínea é dependente da formação prévia do complexo RBP-retinol.[14,15]

O complexo RBP-retinol, ao se ligar à TTR, diminui a excreção renal da vitamina A circulante. Uma vez que o retinol é liberado nos tecidos alvo, a RBP perde a afinidade com a TTR, que é, então, eliminada via filtração glomerular. O complexo TTR-RBP-retinol constitui a forma predominante de retinoides na circulação sanguínea (>95%). A RBP se liga somente às formas naturais da vitamina A; em contraste, os retinoides sintéticos circulam no sangue ligados à albumina sérica.[14]

Captação celular

O complexo vitamina-proteína interage com a membrana celular por meio de receptor para a RBP

(proteína transmembrana designada Stra6). O retinol é separado da RBP e é carregado para dentro da célula, ligado ao transportador RBP celular. Parte desse retinol volta a ser reesterificado e armazenado, com auxílio da LRAT, e outra parte é transformada em AR. O AR é ligado a sua própria proteína transportadora, a proteína transportadora do AR celular (CRABP). O complexo AR-CRABP pode ser translocado para dentro do núcleo, onde pode efetuar ações em âmbito molecular (Figura 12.1).

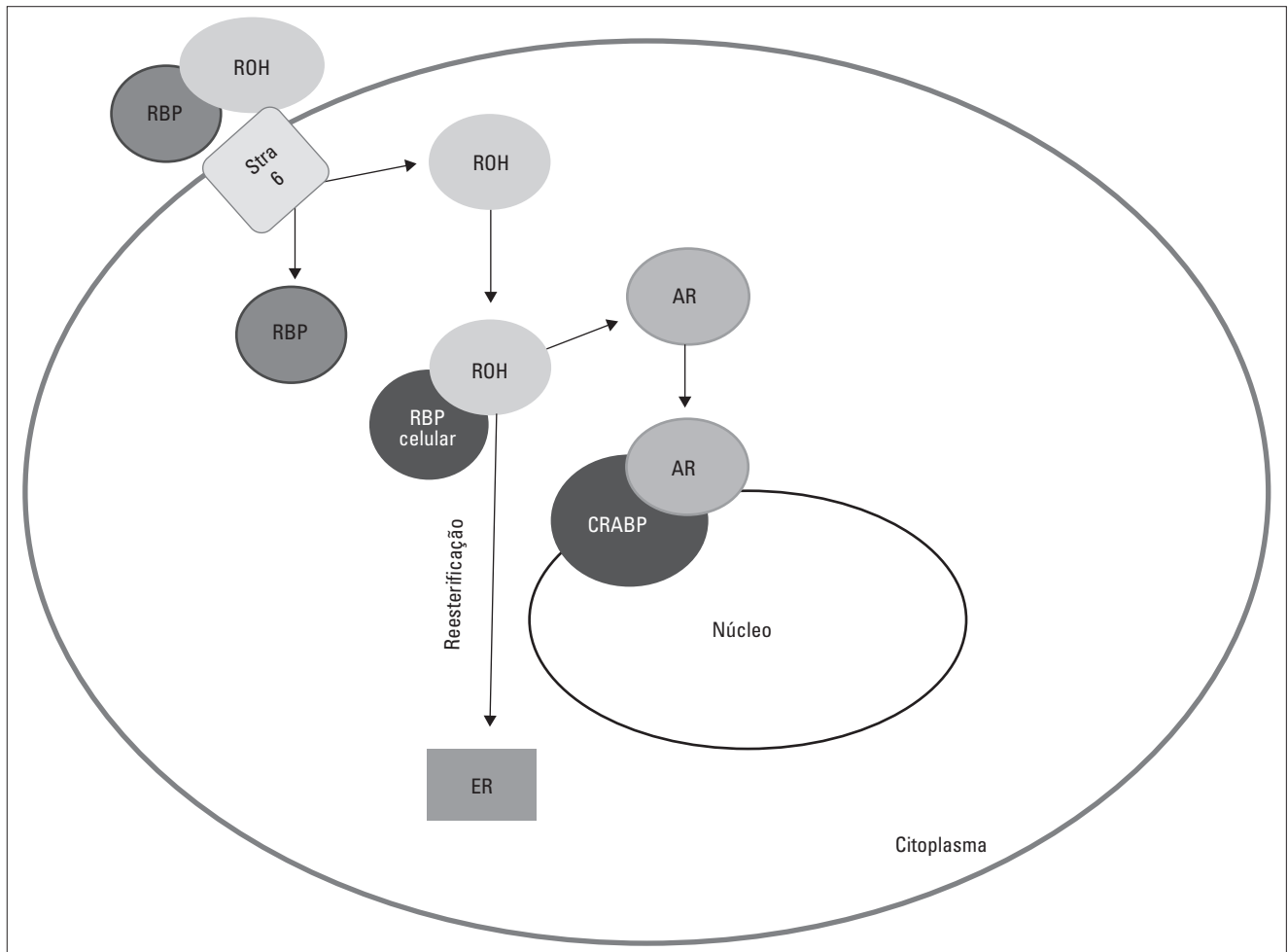



Figura 12.1 Captação celular do retinol (ROH), que, ligado à proteína ligadora de retinol (RBP), interage com o receptor da membrana celular (Stra6). No citosol, o retinol é separado da RBP e liga-se a outra proteína denomidada RPB celular. Parte do retinol pode ser reesterificada em ésteres retinílicos (ER) e outra parte é transformada em ácido retinoico (AR). O AR é ligado à proteína celular ligadora de AR (CRABP). O complexo AR-CRABP pode ser translocado para dentro do núcleo, onde pode efetuar ações em âmbito molecular.

REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA PELO ÁCIDO RETINOICO

O AR todo-*trans* (ATRA, *all-trans retinoic acid*) se liga a receptores nucleares específicos como o RAR – RAR alfa, RAR beta e RAR gama. Os isômeros 9-*cis* e 13-*cis* do AR se ligam ao RXR – RXR alfa, RXR beta e RXR gama. Esses receptores estão presentes em todos os tecidos, principalmente naqueles que apresentam maiores taxas de divisão celular. O ATRA pode, também, se ligar aos receptores ativados por proliferadores de peroxissomos beta e delta (PPAR beta/delta). A ação da vitamina A será determinada em função do receptor ao qual o AR se liga. A ligação com o RAR é regulada pela proteína de ligação do AR celular 2 (CRABP2) e pela proteína ligante de ácidos graxos tipo 5 (FABP5, *fatty acid-binding protein 5*), as quais medeiam a ligação do AR ao PPAR beta/delta.[16] Por exemplo, o AR pode ter efeito de estimular ou suprimir o crescimento tumoral, que pode ser estimulado quando o AR é transportado pela FABP5, mas pode ser suprimido quando o AR é transportado pela CRABP2.[17] Cada transportador ativa diferentes receptores nucleares, o que resulta em respostas dicotômicas em diferentes linhagens celulares e modelos animais, como pode ser observado na Figura 12.2.

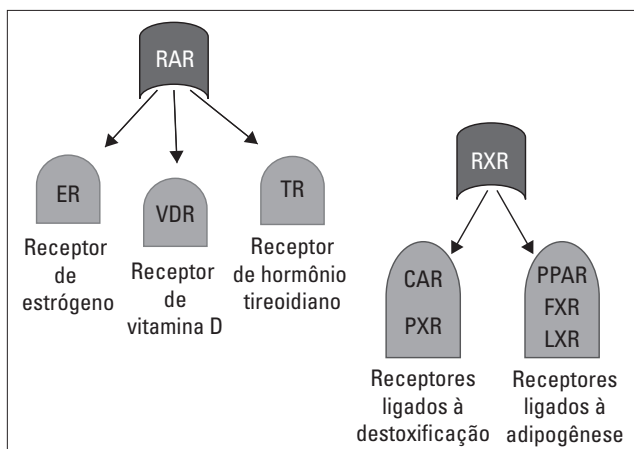



Figura 12.2 Modelo esquemático de interações gênicas por ativação do RAR e RXR – ligações preferenciais.

Figura 12.3 Modelo esquemático que ilustra o papel da proteína ligadora de ácidos graxos 5 (FABP5) e da CRABP2 na regulação do ácido retinoico (AR) (no câncer de mama). Quando a concentração citoplasmática de FABP5 está elevada, em comparação à de CRABP2, o AR se liga preferencialmente à FABP5. Quando a concentração da FABP5 está relativamente baixa em relação à de CRABP2, o AR se liga preferencialmente à CRABP2, diminuindo assim a sobrevivência celular. **Fonte:** Adaptada de Liu et al.[17]

O RAR e o RXR podem ser ativados por ligantes naturais e sintéticos e induzir a expressão de genes-alvo. Uma dessas substâncias é um metabólito do licopeno. Aydemir et al.[18] mostraram em camundongos que, ao administrar licopeno, carotenoide que não possui anel betaionona, forma-se um metabólito que induz a sinalização celular mediada por RAR em alguns órgãos. Desta maneira, o conceito de atividade da vitamina A deve ser dado não por sua estrutura molecular, mas por sua capacidade de interação com o receptor nuclear de AR.

Por outro lado, existem substâncias que podem interagir com os receptores e impedir a ativação da expressão gênica, como o beta-14' apocarotenol, que é formado após a clivagem excêntrica do betacaroteno e pode inibir a ativação dos PPAR (alfa e gama) e do RXR e as respostas biológicas induzidas por seus respectivos agonistas tanto *in vitro* quanto *in vivo*.[19,20]

Por atuarem como fatores de transcrição, os receptores nucleares dependem da ligação a sequências consenso, as quais promovem o aumento da atividade transcricional de genes alvo. Os receptores nucleares esteroides clássicos (receptor de glicocorticoides, receptor de progesterona, receptor androgênico e receptor de estrógeno) se ligam aos elementos de resposta como homodímeros.[21] Os receptores nucleares não esteroides, o RAR, o receptor da vitamina D (VDR, *vitamin D receptor*)[22] e o receptor do hormônio tireoidiano (TR, *thyroid hormone receptor*)[23] se ligam, preferencialmente, aos elementos de resposta como parte de uma ligação heterodímera. O ligante comum nessa interação é o RXR, que pode se ligar, também, a outros receptores, como o receptor de farnesoide X (FXR, *farnesoid X receptor*), o receptor hepático X (LXR, *live X receptor*), os PPAR, o receptor X de pregnano (PXR, *pregnane X receptor*) e o receptor constitutivo de androstano (CAR, *constitutive androstane receptor*) (Figura 12.3).[24]

Uma característica importante dos receptores que atuam na forma de heterodímeros é a possibilidade de serem ativados por ligantes do RXR ou do seu dímero. Essa capacidade de dupla ligação permite que os receptores sejam classificados em heterodímeros permissivos e não permissivos. Os permissivos são aqueles que podem ser ativados por qualquer um dos ligantes e os não permissivos, aqueles que são ativados apenas pelo ligante do dímero, enquanto o RXR permanece inativo.[25] Os dímeros permissivos são PPAR, LXR, FXR, PXR e CAR e os não permissivos são RAR, TR e VDR. Os primeiros respondem aos ácidos graxos oriundos da alimentação, enquanto os não permissivos funcionam primariamente como receptores hormonais e estão sob controle regulatório rigoroso.[26]

O RXR e seus dímeros têm papel importante na regulação do metabolismo energético, pois regulam o conjunto de receptores nucleares que atuam na captação e no estoque de nutrientes e protegem o organismo contra componentes tóxicos.[27]

Por exemplo, no estado prandial, a secreção dos ácidos biliares facilitará a absorção de lipídios por meio de suas propriedades detergentes e também pela ativação do FXR. A ativação do FXR induzirá transitoriamente a expressão de genes que contribuirão para o transporte de nutrientes e ajudará a controlar o crescimento bacteriano relacionado à alimentação e à inflamação intestinal.[28] Além disso, o FXR ativa o metabolismo hepático pós-prandial por meio da liberação do hormônio intestinal FGF19 (fator de crescimento de fibroblastos 19), funcionando como sinal hormonal para o fígado.

A ativação do LXR pelo RXR atua como sensor de esterol que responde ao influxo do excesso de colesterol celular e regula a síntese de ácidos biliares, ativando a transcrição de genes que codificam proteínas associadas à eliminação ou que limitam o acúmulo de colesterol celular. Por meio desse mecanismo, o organismo consegue remover o excesso de colesterol e ocorre a produção de triacilgliceróis para suprir as necessidades dos tecidos periféricos.[29]

O RXR, ao ligar-se aos diferentes PPAR, participa de várias fases relacionadas ao metabolismo energético. Por exemplo, a ativação do PPAR alfa no fígado está associada à oxidação de ácidos graxos;[30] a ativação do PPAR beta/delta no músculo esquelético está associada à regulação de vias do metabolismo glicolítico e oxidativo;[31,32] e a ativação do PPAR gama, no tecido adiposo, regula o armazenamento de energia.[33]

Os receptores de xenobióticos, PXR e CAR, fazem parte do sistema de destoxificação. Esse sistema permite que o organismo elimine as substâncias tóxicas, os metabólitos provenientes da alimentação e de medicamentos, e substâncias como hormônios esteroides e tireoidianos,[34] bem como o AR.[35,36]

É importante também destacar o papel do RXR formando heterodímeros com os receptores não permissivos RAR, VDR e TR. A diferenciação e o desenvolvimento celular são regulados pelas ações do RXR e do RAR combinados; a homeostasia do cálcio e fósforo é controlada pelo heterodímero RXR/VDR, e a taxa metabólica basal é influenciada pelo RXR/TR.[37]

Essa interação entre os receptores nucleares pode mudar em função do *status* de vitamina A. Por exemplo, na deficiência dessa vitamina, foi observado aumento da expressão dos PPAR (alfa e beta) e diminuição da expressão do RXR.[38] Essa situação altera o metabolismo lipídico do coração de ratos, causando prejuízos metabólicos, uma vez que 90% da produção de trifosfato de adenosina (ATP) no coração é oriunda da oxidação de ácidos graxos, que resulta na formação de acetil coenzima A, a qual será oxidada no ciclo de Krebs.[39,40]

GENES ALVO REGULADOS PELO ÁCIDO RETINOICO

Para conhecer o papel biológico do AR é preciso identificar os genes alvo dos retinoides. Para tanto, é necessário o uso de tecnologias como *microarray*, sequenciamento de RNA, imunoprecipitação de cromatina (*ChIPseqmethods*) e modelos de cultura de células e de embriões em que a expressão gênica é estimulada por administração exógena de AR.[41-44] Delacroix et al.[41] verificaram em modelo de fibroblastos de embriões de camundongos a presença de 354 sítios de ligação do RAR e, em células-tronco embrionárias, a presença de 462 sítios. Tais sítios de ligação estavam localizados em genes responsáveis por componentes críticos da via do fator de transformação de crescimento beta (TGF-beta) e eram também envolvidos na regulação e transformação do ciclo celular.

A vitamina A pode exercer, ainda, suas funções por meio de modificações na remodelação da cromatina, ou seja, via mecanismos epigenéticos. Existem dois mecanismos epigenéticos principais pelos quais o AR exerce suas ações: as alterações em histonas e no padrão de metilação do DNA. A cromatina é composta de DNA empacotado sob a forma de nucleossomos, que podem estar na forma de heterocromatina (a cromatina está na forma condensada e os genes estão silenciados) ou de eucromatina (a cromatina está descompactada e os genes estão mais suscetíveis ao processo de transcrição).[45] Por exemplo, Yuan et al.[46] mostraram que a ativação do gene do citocromo P450 26a1 (*Cyp26a1*), mediada pelo AR, envolve descompactação da cromatina, a qual é necessária para a ativação transcricional.

As histonas, em particular sua cauda rica em lisina/arginina, são alvo de modificações pós-transcricionais. Essas modificações podem ocorrer por fosforilação, ubiquitinação, ribosilação, citrulinação, acetilação, entre outros processos.[47,48] O AR induz a transcrição dos genes *HOX*, o que aumenta a metilação ou a acetilação de diversas histonas.[49] Por exemplo, o resíduo de lisina 27 da histona H3 (H3K27) pode ser modificado tanto por acetilação quanto por metilação, com efeitos opostos na cromatina e na atividade transcricional.[50] A abundância de mecanismos envolvidos na transcrição induzida pelo AR permite o ajuste fino da resposta gênica altamente específica.

A regulação da expressão gênica também ocorre por meio de micro RNA (miRNA), pequenos fragmentos de RNA não codificantes que atuam como reguladores endógenos da expressão gênica. O AR regula a expressão de vários miRNA, sugerindo papel relevante na função de miRNA nas vias de sinalização do AR.[51]

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O conhecimento do papel da vitamina A em âmbito molecular é de extrema importância para a caracterização de suas funções metabólicas e para a determinação de novos biomarcadores. É importante lembrar que a deficiência de vitamina A é bastante prevalente e que as lesões oculares diagnosticadas mediante exame clínico são indicadores sensíveis, mas tardios, da deficiência dessa vitamina. Além disso, a presença desse sinal não possibilita a realização de nenhuma ação preventiva.

A determinação das concentrações sanguíneas de retinol e de proteínas de transporte é bastante comum como ferramenta para o diagnóstico de deficiência subclínica. A concentração do retinol e de suas proteínas de transporte é resultado de processos dinâmicos envolvendo ingestão, estocagem, mobilização, utilização e excreção. Assim, suas concentrações são controladas para que não haja liberação insuficiente para suprir as necessidades teciduais ou liberação excessiva, que causariam efeitos tóxicos. O uso de indicadores em nível molecular permitirá o diagnóstico de deficiências subclínicas em situações mais precoces, possibilitando o desenvolvimento de estratégias preventivas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Noy N. Vitamin A. In: Stipanuk MH, Caudill MA. Biochemical, physiological, and molecular aspects of human nutrition. 3.ed. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders; 2012.
2. Mein JR et al. Enzymatic formation of apo-carotenoids from the xanthophyll carotenoids lutein, zeaxanthin and beta-cryptoxanthin by ferret carotene-9',10'-monooxygenase. Arch Biochem Biophys. 2011;506(1):109-21.
3. Blomhoff R, Green MH, Norum KR. Vitamin A: physiological and biochemical processing. Annu Rev Nutr. 1992;12:37-57.
4. Forneris F, Mattevi A. Enzymes without borders: mobilizing substrates, delivering products. Science. 2008;321(5886):213-16.
5. Ross AC, Li NQ. Lung retinyl ester is low in young adult rats fed a vitamin A deficient diet after weaning, despite neonatal vitamin A supplementation and maintenance of normal plasma retinol. J Nutr. 2007;137(10):2213-18.
6. Amengual J et al. Two carotenoid oxygenases contribute to mammalian provitamin A metabolism. J Biol Chem. 2013;288(47):34081-96.
7. Wang Z et al. Beta-Carotene-vitamin A equivalence in Chinese adults assessed by an isotope dilution technique. Br J Nutr. 2004;91(1):121-31.
8. Hendrickson SJ et al. Beta-Carotene 15,15'-monooxygenase 1 single nucleotide polymorphisms in relation to plasma carotenoid and retinol concentrations in women of European descent. Am J Clin Nutr. 2012;96(6):1379-89.
9. Leung WC et al. Two common single nucleotide polymorphisms in the gene encoding beta-carotene 15,15'-monoxygenase alter beta-carotene metabolism in female volunteers. Faseb J. 2009;23(4):1041-53.
10. Lindqvist A et al. Loss-of-function mutation in carotenoid 15,15'-monooxygenase identified in a patient with hypercarotenemia and hypovitaminosis A. J Nutr. 2007;137(11):2346-50.
11. Azevedo PS et al. Ventricular remodeling induced by tissue vitamin A deficiency in rats. Cell Physiol Biochem. 2010;26(3):395-402.
12. Harrison EH. Mechanisms of digestion and absorption of dietary vitamin A. Annu Rev Nutr. 2005;25:87-103.
13. Dawson HD et al. Regulation of hepatic vitamin A storage in a rat model of controlled vitamin A status during aging. J Nutr. 2000;130(5):1280-86.
14. Quadro L et al. Understanding the physiological role of retinol-binding protein in vitamin A metabolism using transgenic and knockout mouse models. Mol Aspects Med. 2003;24:6421-30.
15. Monaco HL, Rizzi M, Coda A. Structure of a complex of two plasma proteins: transthyretin and retinol-binding protein. Science. 1995;268(5213):1039-41.
16. Yu S et al. Retinoic acid induces neurogenesis by activating both retinoic acid receptors (RARs) and peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPARbeta/delta). J Biol Chem. 2012;287(50):42195-205.
17. Liu RZ et al. Association of FABP5 expression with poor survival in triple-negative breast cancer: implication for retinoic acid therapy. Am J Pathol. 2011;178(3):997-1008.
18. Aydemir G et al. Lycopene induces retinoic acid receptor transcriptional activation in mice. Mol Nutr Food Res. 2012;56(5):702-12.
19. Ziouzenkova O, Plutzky J. Retinoid metabolism and nuclear receptor responses: New insights into coordinated regulation of the PPAR-RXR complex. FEBS Lett. 2008;582(1):32-38.
20. Ziouzenkova O et al. Asymmetric cleavage of beta-carotene yields a transcriptional repressor of retinoid X receptor and peroxisome proliferator-activated receptor responses. Mol Endocrinol. 2007;21(1):77-88.
21. Beato M. Transcriptional control by nuclear receptors. Faseb J. 1991;5(1):2044-51.
22. Bouillon R et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. Endocr Rev. 2008;29(6):726-76.
23. Glass CK. Some new twists in the regulation of gene expression by thyroid hormone and retinoic acid receptors. J Endocrinol. 1996;150(53):349-57.
24. Handschin C, Meyer UA. Regulatory network of lipid-sensing nuclear receptors: roles for CAR, PXR, LXR, and FXR. Arch Biochem Biophys. 2005;433(2):387-96.
25. Kurokawa R et al. Differential orientations of the DNA-binding domain and carboxy-terminal dimerization interface regulate binding site selection by nuclear receptor heterodimers. Genes Dev. 1993;7(7B):1423-35.
26. Shulman AI, Mangelsdorf DJ. Retinoid x receptor heterodimers in the metabolic syndrome. N Engl J Med. 2005;353(6):604-15.
27. Vacca M et al. Lipid-sensing nuclear receptors in the pathophysiology and treatment of the metabolic syndrome. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med. 2011;3(5):562-87.
28. Aguiar Vallim TQ, Tarling EJ, Edwards PA. Pleiotropic roles of bile acids in metabolism. Cell Metab. 2013;17(5):657-69.
29. Calkin AC, Tontonoz P. Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR. Nat Rev Mol Cell Biol. 2012;13(4):213-24.
30. Gesta S, Tseng YH, Kahn CR. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. Cell. 2007;131(2):242-56.
31. Eivers SS et al. PGC-1alpha encoded by the PPARGC1A gene regulates oxidative energy metabolism in equine skeletal muscle during exercise. Anim Genet. 2012;43(2):153-62.
32. Lange P et al. Peroxisome proliferator-activated receptor delta: a conserved director of lipid homeostasis through regulation of the oxidative capacity of muscle. PPAR Res. 2008;172676.
33. Dutchak PA et al. Fibroblast growth factor-21 regulates PPARgamma activity and the antidiabetic actions of thiazolidinediones. Cell. 2012;148(3):556-67.
34. Wilson TM, Kliewer SA. PXR, CAR and drug metabolism. Nat Rev Drug Discov. 2002;1(4):259-66.
35. Chen S, Wang K, Wan YJ. Retinoids activate RXR/CAR-mediated pathway and induce CYP3A. Biochem Pharmacol. 2010;79(2):270-76.

36. Wang T et al. Role of pregnane X receptor in control of all-trans retinoic acid (ATRA) metabolism and its potential contribution to ATRA resistance. J Pharmacol Exp Ther. 2008;324(2):674-84.
37. Evans RM, Mangelsdorf DJ. Nuclear receptors, RXR, and the Big Bang. Cell. 2014;157(1):255-66.
38. Vega VA et al. Effect of nutritional vitamin A deficiency on lipid metabolism in the rat heart: its relation to PPAR gene expression. Nutrition. 2009;25(7-8):828-38.
39. Azevedo PS et al. Energy metabolism in cardiac remodeling and heart failure. Cardiol Rev. 2013;21(3):135-40.
40. Jafri MS, Dudycha SJ, O'Rourke B. Cardiac energy metabolism: models of cellular respiration. Annu Rev Biomed Eng. 2001;3:57-81.
41. Delacroix L et al. Cell-specific interaction of retinoic acid receptors with target genes in mouse embryonic fibroblasts and embryonic stem cells. Mol Cell Biol. 2010;30(1):231-44.
42. Mahony S et al. Ligand-dependent dynamics of retinoic acid receptor binding during early neurogenesis. Genome Biol. 2011;12(1):12:R2.
43. Kim M et al. Regulation of mouse embryonic stem cell neural differentiation by retinoic acid. Dev Biol. 2009;328(2):456-71.
44. Savory JG et al. Cdx2 regulation of posterior development through non-Hox targets. Development. 2009;136(24):4099-110.
45. Dawson MA, Kouzarides T, Huntly BJ. Targeting epigenetic readers in cancer. N Engl J Med. 2012;367(7):647-57.
46. Yuan W et al. Dense chromatin activates Polycomb repressive complex 2 to regulate H3 lysine 27 methylation. Science. 2012;337(6097):971-75.
47. Tan M et al. Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. Cell. 2011;146(6):1016-28.
48. Yang XJ. Multisite protein modification and intramolecular signaling. Oncogene. 2005;24(11):1653-62.
49. Kashyap V et al. RAR is essential for retinoic acid induced chromatin remodeling and transcriptional activation in embryonic stem cells. J Cell Sci. 2013;126(4):999-1008.
50. Creyghton MP et al. Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. Proc Natl Acad Sci USA. 2010;107(50):21931-36.
51. Nervi C, Grignani F. RARs and microRNAs. Subcell Biochem. 2014;70:151-79.

13 Vitaminas do complexo B e metabolismo de um carbono

Elvira Maria Guerra-Shinohara
Clóvis Paniz
Guilherme Wataru Gomes

INTRODUÇÃO

As vitaminas do complexo B compreendem um grupo de substâncias hidrossolúveis composto por tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina (B3), ácido pantotênico (B5), piridoxina (B6), biotina (B7), ácido fólico (B9) e as cobalaminas (B12). No entanto, apenas as vitaminas B2, B6, ácido fólico e B12 estão relacionadas ao metabolismo de um carbono.

O metabolismo de um carbono compreende as vias de remetilação e transulfuração da homocisteína e a formação da S-adenosilmetionina (SAM), que está relacionada às reações de metilação (DNA, RNA, proteínas, neurotransmissores, fosfolipídios e histonas).[1-3] Nessas vias, ocorre a doação de um grupo metil (doação de um carbono) em presença de ácido fólico, riboflavina (representada pela flavina adenina dinucleotídeo – FAD), e vitaminas B6 e B12[4] (Figura 13.1).

Enquanto a metionina é um aminoácido essencial no metabolismo dos mamíferos, a homocisteína é uma substância aminada sulfurada, derivada da metionina que, entretanto, não faz parte de proteínas.[5] Na via de remetilação, a homocisteína recebe um grupo metil do 5-metil-tetra-hidrofolato (5-metil-THF), em presença da enzima metionina sintase (MTR) e da metil-B12, o que dá origem à metionina e ao tetra-hidrofolato (THF), enquanto a metionina sintase redutase (MTRR) catalisa a redução da B12 oxidada (cob(II)alamina) a metil-B12, usando a SAM como doador de grupamento metil[6] e mantendo as concentrações de metil-B12 adequadas para serem utilizadas pela MTR na reação de metilação da homocisteína à metionina. Na via da transulfuração, a homocisteína é catabolizada à cistationina pela ação da enzima cistationina beta sintase (CBS), na presença da coenzima vitamina B6 (Figura 13.1).[4]

O ácido fólico e a B12 são vitaminas necessárias para a duplicação celular por participarem da síntese de purinas e pirimidinas, do metabolismo da homocisteína e de reações de metilação.[7,8] Na deficiência grave de uma dessas vitaminas, ou de ambas, pode ocorrer a anemia megaloblástica, que afeta a hematopoese em seu conjunto (séries vermelha, branca e plaquetária) e, também, outros tecidos do organismo com intensa capacidade regenerativa celular, como os epitélios e as mucosas.[9-12] Além disso, a deficiência por si só pode causar várias alterações bioquímicas que interferem no metabolismo.[13-17]

A vitamina B6 atua como coenzima de diversas reações, com ação no metabolismo de proteínas, lipídios e carboidratos. Uma de suas funções está relacionada ao metabolismo de um carbono. Já a riboflavina é necessária na síntese de FAD e de flavina mononucleotídeo (FMN), dois cofatores enzimáticos essenciais no funcionamento de enzimas importantes em diversas vias metabólicas, incluindo o metabolismo de um carbono.

Este capítulo descreve o metabolismo das vitaminas do complexo B e da homocisteína, bem como aspectos bioquímicos e genéticos relacionados ao metabolismo de um carbono e os principais polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) relacionados ao metabolismo do ácido fólico, B12, B2, B6 e homocisteína.

ÁCIDO FÓLICO

Metabolismo

O ácido fólico é uma vitamina necessária à saúde humana. Ele está relacionado à transferência de uma unidade de carbono na síntese das purinas (formila, –CHO), na síntese de timidina (metileno, $–CH_2–$), na síntese de

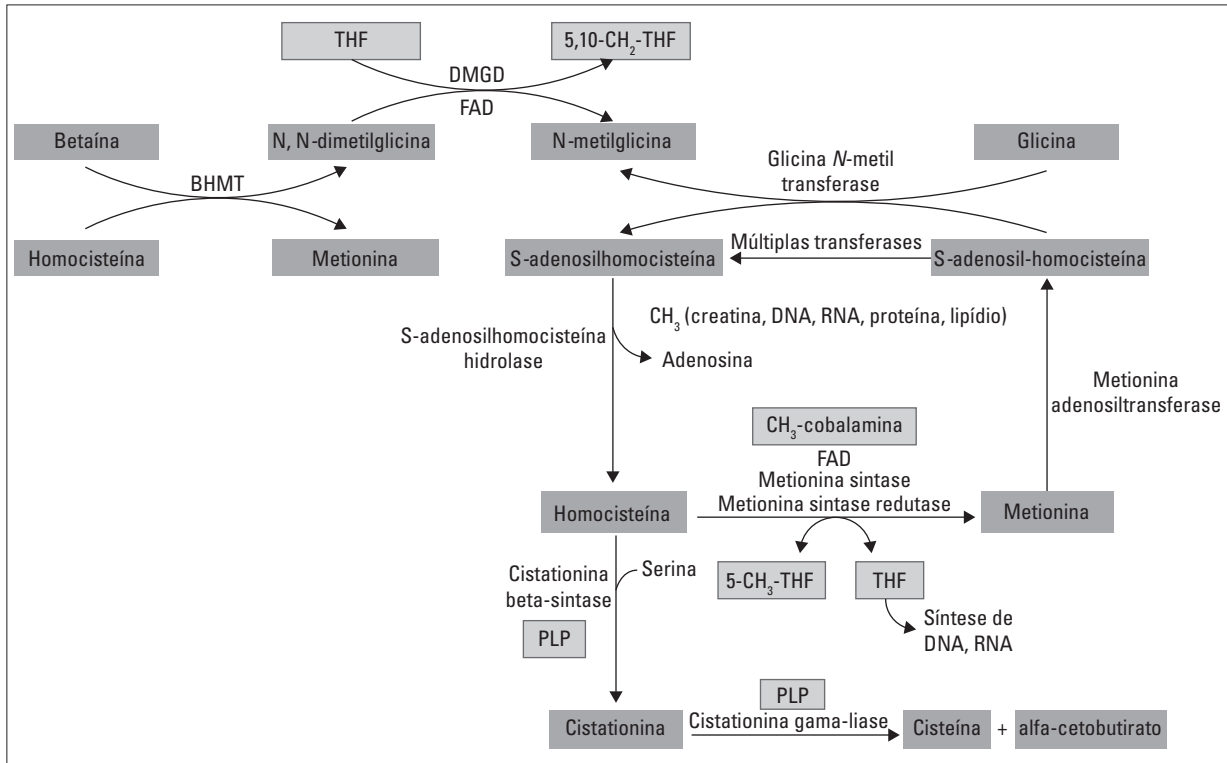



Figura 13.1 Metabolismo da homocisteína e da metionina. As vitaminas estão marcadas em quadrados cinza-claro e os metabólitos em cinza. BHMT: betaína-homocisteína metiltransferase; DMGD: dimetilglicina deidrogenase; FAD: flavina adenina dinucleotídeo; PLP: piridoxal-5'-fosfato; THF: tetra-hidrofolato. **Fonte:** Guerra-Shinohara et al.[18]; Stabler et al.[19]

metionina (metil, $-CH_3$) e também na conversão de serina em glicina.[8, 20-22]

A estrutura química do ácido fólico consiste em um anel de pteridina, uma molécula de ácido p-aminobenzoico (PABA) e uma molécula de ácido glutâmico. A forma monoglutamato de ácido fólico (forma sintética) é utilizada em suplementos vitamínicos, na terapêutica e na fortificação de alimentos,[23] sendo a forma mais oxidada e a que possui maior estabilidade.[24]

O termo folato é usado para designar o ácido fólico na forma de poliglutamato (com dois a oito resíduos de ácido glutâmico), presente naturalmente nos alimentos.[25] A forma de monoglutamato tem biodisponibilidade muito maior que a forma de poliglutamato, sendo descrito que 0,6 µg de ácido fólico equivale a 1 µg de folato da alimentação.[25, 26]

O principal local de absorção do folato é o jejuno proximal. No processo de absorção, a forma de poliglutamato é hidrolisada à forma de monoglutamato pela enzima folilpoli-gama-glutamato carboxipeptidase (FGCP ou GCPII), uma exopeptidase que está ancorada à membrana apical dos enterócitos,[20, 26] como apresentado na Figura 13.2.

A forma de monoglutamato é transportada para dentro das células por duas famílias de receptores: o carreador de folato reduzido (RFC1) e os receptores de folato humano (hFR).[26, 27] Tanto a hidrólise quanto o transporte ocorrem em pH 6 no microambiente da vilosidade do jejuno.[27]

O folato intracelular é convertido em poliglutamato pela enzima folilpoliglutamato sintase (FPGS) ATP-dependente, enquanto a enzima c-glutamil hidrolase (GGH) remove os glutamatos terminais que estão ligados ao resíduo glutamato proximal (Figura 13.2). A conversão intracelular de folato na forma de poliglutamato é uma maneira de aprisionamento metabólico, que impede sua perda celular por meio de transportadores de efluxo. Além disso, a forma de poliglutamato é melhor substrato que a forma de monoglutamato para enzimas intracelulares dependentes de folato.[28]

Após a absorção celular, a maior parte do monoglutamato é reduzida e metilada, aparecendo na circulação principalmente na forma de 5-metil-THF.[26] Essa forma é necessária na remetilação da homocisteína à metionina e na formação do THF . Essa reação depende da coenzima metil-B12, da enzima MTR e da FAD, como representado nas Figuras 13.1 e 13.2.

No ciclo do folato, o THF recebe um grupamento metil da serina em presença da enzima serina hidroximetiltransferase (SHMT) e da vitamina B6, formando 5,10-metileno-THF e glicina.

O 5,10-metileno-THF pode ser usado na síntese de timidina, sendo convertido a di-hidrofolato (DHF), que

Figura 13.2 Esquema simplificado do metabolismo intracelular do folato e das reações de transferência de um carbono nas células epiteliais. Destaque às proteínas envolvidas na hidrólise intraluminal do folato. GCPII: folilpoli-gama-glutamato carboxipeptidase; absorção de ácido fólico intracelular (FR-a: receptor de folato; RFC: transportador de folato reduzido); retenção de folato intracelular (FPGS: folilpoliglutamil sintase), hidrólise e efluxo (GGH: c-glutamil hidrolase); ciclo da homocisteína (MTR: metionina sintase; MTRR: metionina sintase redutase; MTHFR: metilenotetra-hidrofolato redutase); manutenção da concentração de ácido fólico intracelular (DHFR: di-hidrofolato redutase; SHMT: serina hidroxilmetiltransferase); biossíntese de nucleotídeos (TS: timidilato sintase); metilação do DNA (DNMT1, 3a, 3b, CpG metiltransferases) e desmetilação do DNA (MBD2, DNA demetilase). Cbl: cobalamina; CH_3: grupo metil; CpG: sequência dinucleotídeo citosina-guanina; DHF: di-hidrofolato; dTMP: desoxitimidina-5-monofosfato (timidilato); dUMP: desoxiuridina-5-monofosfato; FAD: flavina adenina dinucleotídeo; Hcy: homocisteína; Met: metionina; RFC: transportador de folato reduzido; SAH: S-adenosil-homocisteína; SAM: S-adenosilmetionina; THF: tetra-hidrofolato. O círculo cinza-claro representa um anel de pteridina conjugado com PABA. O triângulo cinza representa um glutamato, que está unido por uma ligação peptídica (forma de poliglutamato). As enzimas estão representadas em quadrados cinza, em branco estão os transportadores, em preto as vitaminas e em cinza-escuro a membrana da célula. **Fonte:** Kim.[26]

posteriormente será reduzido a THF pela di-hidrofolato redutase (DHFR).[29, 30] O 5,10-metileno-THF pode ainda ser convertido a 5,10-metenil-THF, 10-formil-THF e THF pela ação da enzima metilenotetra-hidrofolato desidrogenase (MTHFD1). O 5,10-metileno-THF também pode ser convertido a 5-metil-THF na presença da enzima metilenotetra-hidrofolato redutase (MTHFR), que é uma enzima dinucleotídeo de nicotinamida-adenina difosfato ($NADP^+$)-dependente (Figuras 13.2 e 13.3).

A MTHFD1 é uma enzima citoplasmática trifuncional dependente de $NADP^+$, também chamada de 5,10-metilenotetra-hidrofolato desidrogenase ou 5,10-meteniltetra-hidrofolato cicloidrolase ou 10-formiltetra-hidrofolato sintase. A atividade da MTHFD1 é essencial para a síntese do DNA, provendo 10-formil-THF e 5,10-metileno-THF para síntese *de novo* de purinas e timidalato[31-33] (Figuras 13.2 e 13.3).

A DHFR também é uma enzima dependente de $NADP^+$ que desempenha importante atividade na conversão do ácido fólico sintético presente em suplementos e alimentos fortificados para uma forma fisiologicamente ativa de folato, reduzindo o ácido fólico para DHF e, desta maneira, permitindo o uso dessa vitamina pelas células[34] (Figuras 13.2 e 13.3).

É importante destacar que, na deficiência grave de B12, a conversão do 5-metil-THF a THF fica comprometida, enquanto o 5-metil-THF, por ser metabolicamente inaproveitado, fica sequestrado dentro da célula.[12] Além

disso, concentrações inadequadas de folato acarretam o acúmulo de deoxiuridilato (dUMP),[35, 36] causando a incorporação de uma uracila ao DNA,[37] resultando em danos de quebra na fita dupla.[38]

Vários marcadores têm sido utilizados para caracterizar a deficiência de folato no organismo, como a concentração dessa vitamina (no soro e nos eritrócitos) e os marcadores funcionais (homocisteína total e ácido metilmalônico). A combinação de parâmetros, como a concentração de folato sérico < 5 ng/mL (ou < 11,3 nmol/L), homocisteína total > 13,9 μmol/L e ácido metilmalônico ≤ 271 nmol/L, tem sido considerada marcador da deficiência de folato no organismo.[18] A concentração sérica de folato pode ser alterada pelo consumo alimentar nos dias anteriores à coleta do sangue; por isso, tem sido recomendada a determinação concomitante do folato eritrocitário, que é um indicador das concentrações dessa vitamina em médio prazo (cerca de três meses).[39, 40]

Deficiência de ácido fólico

A deficiência de folato decorre do consumo inadequado dessa vitamina (má nutrição, idade avançada, situação econômica desfavorável, alcoolismo, hemodiálise, entre outras causas), absorção diminuída (enteropatias) e aumento das necessidades (gestação, aumento da renovação celular, anemia hemolítica crônica, dermatite esfoliativa etc.). Além disso, polimorfismos em genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo do ácido fólico estão relacionados com concentrações plasmáticas reduzidas dessa vitamina.[42]

A deficiência de folato é associada a complicações obstétricas[43] e malformações fetais (lábio leporino, fenda palatina e defeitos de fechamento do tubo neural – DFTN).[44] Os DFTN são malformações congênitas graves que ocorrem como resultado de falha no fechamento do tubo neural no início da gestação (24 a 28 dias após a concepção).

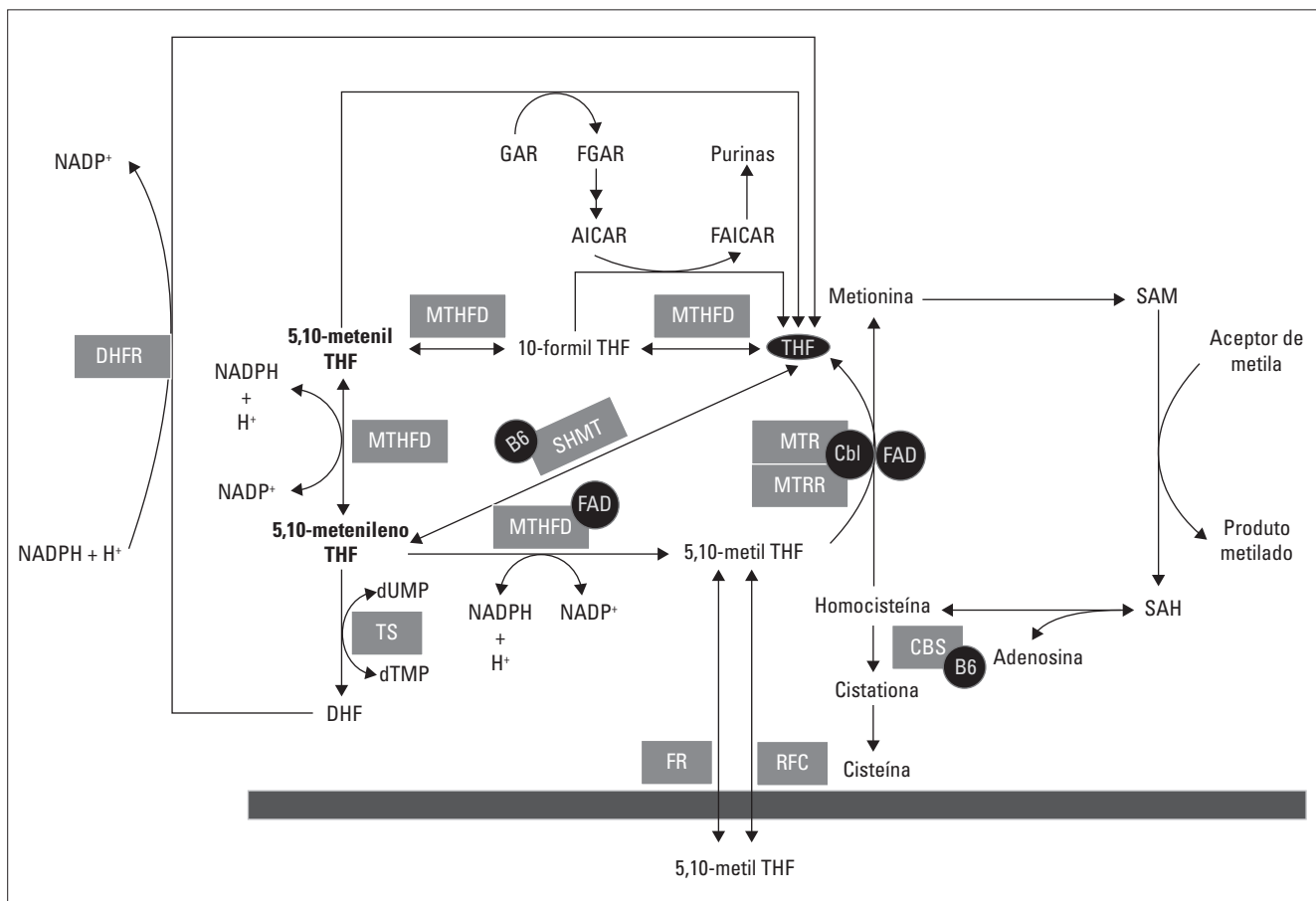



Figura 13.3 Ciclo do folato, com destaque ao papel da enzima MTHFD1 na conversão dos intermediários 5,10-metileno-THF, 5,10-metenil-THF, 10-formil-THF e THF. AICAR: 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo; BHMT: betaina-homocisteína metiltransferase; B6: piridoxal 5'-fosfato; Cbl: cobalamina; CBS: cistationina beta sintase; DHF: di-hidrofolato; DHFR: di-hidrofolato redutase; FAD: flavina adenina dinucleotídeo; FAICAR: formil-5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo; FGAR: formil glicinamida ribonucleotídeo; FR: receptor de folato; GAR: glicinamida ribonucleotídeo; MTHFD1: metilenotetra-hidrofolato desidrogenase; MTHFR: metilenotetra-hidrofolato redutase; MTR: metionina sintase; MTRR: metionina sintase redutase; RFC: transportador de folato reduzido; SAH: S-adenosil-homocisteína; SAM: S-adenosil-metionina; SHMT: serina hidroximetiltransferase; THF: tetra-hidrofolato; TS: timidalato sintase. Quadrados cinza estão representando as enzimas ou os transportadores, em preto estão as vitaminas e em cinza-escuro está representada a membrana da célula. **Fonte:** adaptada de van der Linden et al.[41]

A relação entre deficiência de folato e ocorrência de DFTN foi demonstrada em vários estudos. Em 1991, nos Estados Unidos, o Centers for Diseases Control and Prevention (CDC) recomendou que mulheres com história prévia de DFTN deveriam consumir 4.000 µg de ácido fólico/dia, começando no período em que estivessem planejando ficar grávidas;[45] para mulheres que não tenham história prévia de DFTN e que planejam engravidar, a recomendação de uso é de 400 µg de ácido fólico/dia no período anterior à gravidez.

Além disso, a deficiência de folato também é associada a alterações no padrão de metilação do DNA, ou seja, na hipometilação em alguns oncogenes[46-48] e na hipermetilação de genes supressores tumorai,[49-51] o que pode influenciar a expressão gênica e aumentar o risco de câncer.[2, 37] É também relacionada ao erro de incorporação da uracila durante a síntese de DNA, o que promove instabilidade genômica, resultando em danos de quebra.[38] Além disso, baixas concentrações de folato são associadas a concentrações elevadas de homocisteína total, que, por sua vez, são consideradas fator de risco para doença cardiovascular.[52, 53] Ademais, o aumento das concentrações de homocisteína total também foi associado à demência[54, 55] e à doença de Alzheimer.[56]

Impacto da fortificação de alimentos com ácido fólico

A associação entre a deficiência de folato e o maior risco de DFTN levou vários países a fortificarem alimentos com ácido fólico.[23] Nos Estados Unidos, a fortificação foi iniciada em 1998, seguida por Canadá e Chile. Já no Brasil, a fortificação mandatória teve início em julho de 2004, após a publicação da RDC n. 344, de 13 de dezembro de 2002, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, quando ficou estabelecido que as farinhas de trigo e milho deveriam ser fortificadas com 150 µg de ácido fólico e 4,2 mg de ferro para cada 100 g de farinha.[57]

Estima-se que o consumo habitual de ácido fólico tenha dobrado nos países que adotaram a fortificação, o que implicou um drástico aumento nas concentrações plasmáticas de folato da população. Esse aumento atinge especialmente crianças e idosos, grupos da população que apresentam hábitos de alto consumo de pães e/ou suplementos alimentares.[58] Além disso, o uso de multivitamínicos sem prescrição pode levar à ingestão diária de 400 a 800 µg de ácido fólico[59] que, somados ao total proveniente da alimentação, podem elevar significativamente as concentrações plasmáticas de folato.

A fortificação dos alimentos com ácido fólico reduziu a incidência de DFTN em vários países.[24, 60-62] No entanto, a fortificação compulsória tem sido criticada incisivamente por alguns pesquisadores, que questionam o benefício dessa fortificação para algumas mães e crianças, tendo em vista o potencial risco de expor toda a população ao excesso de ingestão dessa vitamina.[58] Estimou-se, no Reino Unido, que aproximadamente 77 a 162 gestações com DFTN seriam evitadas a cada ano por meio da fortificação com concentração de 300 µg de ácido fólico por 100 g de farinha. Em contrapartida, cerca de 370.000 a 780.000 pessoas seriam expostas a essa vitamina para cada recém-nascido sem DFTN.[58] Com base nesses resultados, há alertas sobre o risco de expor a população a danos graves ou efeitos adversos leves que poderiam resultar dessa fortificação. No Brasil, não há estudos que tenham avaliado o impacto da fortificação de modo abrangente no território nacional, realizando exames bioquímicos que avaliem as concentrações de folato no sangue da população. Entretanto, uma revisão de estudos com um pequeno número de indivíduos, realizados em diferentes regiões do Brasil, mostrou que, após a implementação da fortificação das farinhas de trigo e milho com ácido fólico, as concentrações de folato sérico aumentaram 57% em crianças e adolescentes saudáveis e em 174% em adultos saudáveis. A análise mostrou, ainda, que houve redução na incidência de DFTN.[63]

Com a efetivação da fortificação das farinhas com ácido fólico em vários países, a comunidade científica tem discutido os riscos de concentrações elevadas de ácido fólico não metabolizado no organismo.[26, 58, 64-67]

Sabe-se que o ácido fólico sintético só é incorporado ao metabolismo celular quando reduzido pela DHFR.[65] Assim, a baixa atividade e/ou a saturação dessa enzima podem ser fatores limitantes para a redução do ácido fólico em pessoas que consomem quantidades superiores à ingestão tolerável de 1 mg/dia da vitamina, levando ao aumento de ácido fólico não metabolizado na circulação sanguínea.[59, 67]

Mostrou-se, em estudo realizado na era pós-fortificação, com norte-americanas menopausadas, o aumento de ácido fólico não metabolizado em cerca de 78% das mulheres após uma noite de jejum. Foi demonstrado que a citotoxicidade das células *natural killer* (NK) estava diminuída em mulheres com altas concentrações de ácido fólico não metabolizado, independentemente das concentrações de folato total e de 5-metil-THF.[68] Evidências experimentais e clínicas demonstraram o papel das células NK na destruição de células tumorais, podendo ser consideradas a primeira linha de defesa do sistema imune contra a carcinogênese. A diminuição da citotoxicidade das células NK pode aumentar o risco ou a gravidade de infecções e foi associada ao aumento futuro da incidência de câncer.[69]

O DHF também inibe a enzima purina sintase[70] e a MTHFR,[71] podendo, portanto, reduzir a formação de

5-metil-THF e levar à diminuição da síntese de metionina. Como a metionina é um precursor da SAM, sua redução interfere nas reações de metilação de ácidos nucleicos, neurotransmissores, fosfolipídios e outras reações.[72] Ademais, acredita-se que o ácido fólico não metabolizado possa também mascarar a deficiência de B12, levando ao agravamento dos danos neurológicos associados a uma deficiência prolongada dessa vitamina.[73] Demonstrou-se também que idosos que ingerem maior quantidade de folato apresentaram maior taxa de declínio cognitivo, sugerindo que o excesso de ácido fólico proveniente do uso de multivitaminas e de alimentos fortificados poderia ter efeitos nocivos na saúde dessa população.[74]

COBALAMINA

Metabolismo

A B12 é uma vitamina única entre as demais, não apenas por se apresentar como uma molécula orgânica complexa, mas por conter um elemento traço essencial, o cobalto. Um átomo desse elemento (na forma de Co^{3+}) está coordenado a um complexo sistema em anel de corrina, que é quimicamente relacionado ao sistema em anel porfirínico do grupo heme. Uma quinta posição de coordenação do cobalto é preenchida por um nucleotídeo, o dimetilbenzimidazol ribonucleotídeo, ligado covalentemente por seu grupo 3'-fosfato à cadeia lateral do anel de corrina por meio do aminoisopropanol. Na sexta posição de coordenação do cobalto, há um radical que pode ser o grupo ciano (cianocobalamina – ciano-B12 ou vitamina B12), o grupo hidroxila (hidroxicobalamina – hidroxi-B12), o grupo 5'-desoxiadenosilcobalamina (5'desoxiadenosil-B12 ou adenosil-B12) ou o grupo metil (metilcobalamina – metil-B12).

A metil-B12 é a principal forma de B12 presente no plasma humano, ao passo que a adenosil-B12 é a principal forma de armazenamento, principalmente no fígado. O termo vitamina B12 tem sido empregado como designação genérica para caracterizar as B12, porém esse termo é mais adequado para indicar a ciano-B12, que é a forma utilizada em suplementos.

As formas de adenosil-B12 e metil-B12 atuam como coenzimas em duas reações metabólicas. A adenosil-B12 participa da conversão intramitocondrial de metilmalonil coenzima A (CoA) para succinil-CoA em presença da enzima metilmalonil-CoA mutase, enquanto a metil-B12 participa da conversão citosólica da homocisteína para metionina por intermédio da MTR[75] (Figura 13.4).

No trato gastrintestinal superior, a B12 é liberada dos alimentos e se liga à haptocorrina (HC, também chamada de proteína R ou transcobalamina I – TCI), proteína presente na saliva e no suco gástrico.[76] Essa ligação da B12 à HC é um mecanismo que protege a vitamina da hidrólise no meio ácido do estômago. No duodeno, o complexo B12-HC é desmembrado, a HC é degradada por enzimas pancreáticas e a B12 se liga ao fator intrínseco (FI), que é secretado pelas células parietais da mucosa da parede gástrica (Figura 13.4). No íleo terminal, o complexo B12-FI é absorvido por endocitose mediada pelo receptor Cubam, que consiste em duas moléculas: a cubilina (que é uma proteína de membrana periférica que se liga ao complexo B12-FI) e a *amnionless* (AMN, uma proteína endocítica transmembrana). No enterócito ileal, o FI é degradado e a B12 é liberada para o plasma através da membrana basolateral da célula pelo transportador *ATP binding cassette* C1 (ABCC1), também denominado MRP1.[76]

No plasma, a B12 se liga à HC (TCN1 e TCN3) ou à transcobalamina (TCN2). A TCN2 é responsável pela entrega da B12 para as células de tecidos periféricos. No fígado e em outros tecidos, a absorção da B12-TCN2-dependente é mediada pelo receptor CD320, enquanto o receptor megalina é responsável pela reabsorção do complexo nos rins.[76]

Concentrações séricas elevadas de homocisteína total e de MMA são consideradas marcadores funcionais da deficiência de B12 nos tecidos.[19,77-79] No entanto, valores aumentados de homocisteína total no plasma podem ser decorrentes de deficiência isolada de vitaminas (B12, folato ou vitamina B6) ou da combinação delas, ou podem ser consequência de alterações nas atividades de enzimas ou de transportadores em razão da presença de polimorfismos em genes relacionados ao metabolismo do folato (*GCPII*, *RFC1*, *MTHFR, MTHFD1*, entre outros), da homocisteína (*MTR*, *MTRR* e *CBS*) e da B12 (transcobalamina – *TC2* ou *TCN2, FUT2*). Por sua vez, concentrações aumentadas de MMA podem ser encontradas em indivíduos com deficiência de B12, em pacientes com erros inatos do metabolismo relacionados a essa vitamina e com disfunção renal.

No plasma, cerca de 20% da B12 está ligada à TCN2 e o restante está ligado à HC. A concentração de TCN2 pode ser quantificada por meio da dosagem de holo-transcobalamina (holo-TC), que é o complexo TCN2 ligado à B12. Concentrações plasmáticas reduzidas de holo-TC (< 45 pmol/L) têm sido consideradas um marcador precoce de deficiência tecidual dessa vitamina[80] em várias populações: mulheres gestantes de fetos com DFTN,[81] vegetarianos,[82] adultos com valores reduzidos de B12 (< 200 pmol/L),[83] adultos eutróficos e adultos com doença coronariana,[84] pacientes com câncer[80] e pacientes com doença de Alzheimer.[85]

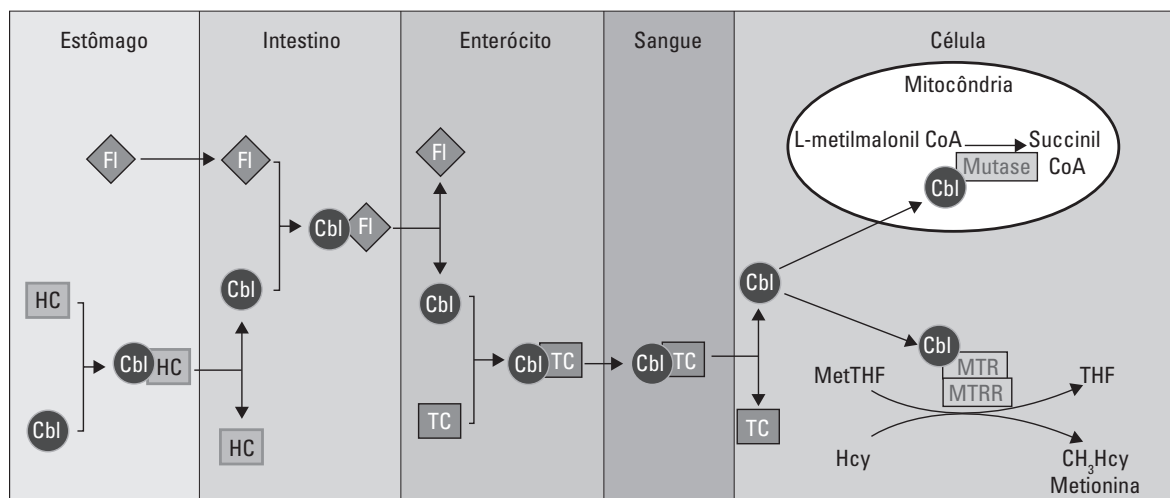



Figura 13.4 Metabolismo da cobalamina. Cbl: cobalamina; FI: fator intrínseco; HC: haptocorrina; Hcy: homocisteína; Met: metil; MTR: metionina sintase; MTRR: metionina sintase redutase; Mutase: L-metilmalonil CoA-mutase; TC: transcobalamina; THF: tetra-hidrofolato. **Fonte:** adaptada de van der Linden et al.[41]

No que se refere à deficiência de vitamina B12, um estudo realizado por Guerra-Shinohara et al.[18] avaliou as concentrações de SAM, SAH, MMA, homocisteína total, metionina, cistationina, N,N-dimetilglicina, N-metilglicina e ácido 2-metilcítrico em pacientes que apresentavam anemia, macrocitose e citopenias no sangue periférico. Foi utilizado o seguinte critério para caracterizar a deficiência de B12: homocisteína total > 13,9 µmol/L, concentração de MMA > 271 nmol/L e superior à concentração de ácido 2-metilcítrico e B12 sérica < 350 pg/mL (< 258 pmol/L). Entre os pacientes, 15 tiveram anemia megaloblástica por deficiência grave de B12 confirmada e, nos 19 pacientes restantes, a causa da anemia era outra. O fato mais surpreendente, porém, foi encontrar 7 dos 15 pacientes com deficiência grave de B12 fazendo uso terapêutico de ácido fólico por intervalos de uma semana até um ano antes da coleta do sangue para esse estudo. Nos 15 pacientes, observou-se aumento de MMA, homocisteína total, cistationina, ácido 2-metilcítrico, N,N-dimetilglicina e SAH, e reduzida razão SAM/SAH (razão de 2,5), juntamente com pancitopenia, redução do hematócrito e aumento do volume corpuscular médio (VCM). Esses resultados mostraram que a razão SAM/SAH pode ser um marcador de deficiência de B12, juntamente com MMA, homocisteína total e holo-TC.

Os 15 pacientes foram tratados com ciano-B12 intramuscular; após o tratamento, os pacientes foram recrutados para repetir os exames. Dos 15 pacientes com anemia megaloblástica, 10 retornaram. Estes pacientes apresentaram melhora no quadro hematológico, com exceção do número de plaquetas.[18] As concentrações dos metabólitos diminuíram 34 vezes para MMA; 12 para homocisteína total; 7,2 para ácido 2-metilcítrico; 3,3 para cistationina e 1,9 para SAH, ao passo que a razão SAM/SAH aumentou 1,6 vez. Não houve diferença significativa entre as concentrações antes e após o tratamento para a metionina, SAM, N-metilglicina e N,N-dimetilglicina. Esses dados mostram a importância da vitamina B12 no metabolismo de um carbono, demonstrando a correção dos valores de parâmetros hematológicos e bioquímicos após o tratamento nesse grupo de pacientes com anemia megaloblástica.

Estado nutricional em relação à vitamina B12 e ao ácido fólico e seu papel no metabolismo de um carbono em mulheres

As mulheres em idade reprodutiva necessitam de concentrações séricas de folato e de B12 adequadas, uma vez que essas duas vitaminas são importantes na duplicação celular e participam do metabolismo de um carbono. Um estudo mostrou as concentrações de vitaminas e metabólitos em mulheres não gestantes antes do início da fortificação das farinhas de trigo e milho no Brasil. Na Tabela 13.1 estão apresentados os valores das vitaminas e metabólitos. As concentrações neonatais de folato sérico, SAM e SAH foram, em média, duas vezes maiores que as encontradas em suas mães, possivelmente para compensar a grande taxa de duplicação celular do neonato (Tabela 13.2).

Tabela 13.1 Concentrações de vitamina B12, de folato e de metabólitos em 102 mulheres não gestantes no Brasil

	Mulheres não gestantes*	Valores de referência**
B12 (pmol/L)	255,0 (234,0 – 278,0)	>258,0
Folato sérico (nmol/L)	15,2 (14,1 – 16,4)	>11,3
MMA (nmol/L)	202,0 (181,0 – 226,0)	73,0 – 271,0
Homocisteína total (μmol/L)	8,4 (7,9 – 8,9)	5,4 – 13,9
Cistationina (nmol/L)	167,0 (156,0 – 179,0)	44,0 – 342,0
Ácido 2-metilcítrico (nmol/L)	139,0 (133,0 – 146,0)	60,0 – 228,0
Cisteína (μmol/L)	265,0 (259,0 – 272,0)	
Metionina (μmol/L)	28,5 (26,6 – 30,5)	13,0 – 45,0
Glicina (μmol/L)	231,0 (218,0 – 244,0)	
Serina (μmol/L)	124,0 (120,0 – 129,0)	
N, N-dimetilglicina (μmol/L)	4,1 (3,8 – 4,5)	1,4 – 5,3
N-metilglicina (μmol/l)	1,4 (1,3 – 1,5)	0,6 – 2,7
SAH (nmol/l)	17,2 (15,5 – 19,0)	8,0 – 26,0
SAM (nmol/l)	79,7 (76,0 – 83,6)	71,0 – 168,0
Razão SAM/SAH	4,6 (4,2 – 5,1)	4,4 – 12,4

B12: cobalamina; MMA: ácido metilmalônico; SAH: S-adenosil-homocisteína; SAM: S-adenosil-metionina. Os dados apresentados na tabela são médias geométricas (IC 95%). **Fonte:** * Barbosa et al.[86] ** Allen et al.[78], Stabler et al.[3]

A distribuição das parturientes em grupos segundo as concentrações de B12 (em quartis) mostrou que mulheres com as menores concentrações (≤ 102 pmol/L) apresentaram menores concentrações também de folato sérico, SAM e metionina, e menor razão SAM/SAH. Além disso, apresentaram concentrações maiores de homocisteína total e SAH quando comparadas às concentrações de mulheres com valores de B12 ≥ 163 pmol/L (≥ 221 pg/mL). Já os recém-nascidos cujas mães tinham valores menores de B12 apresentaram menores concentrações dessa vitamina e da razão SAM/SAH, e maiores concentrações de homocisteína total e MMA (tendência, P = 0,08) quando comparados às concentrações de recém-nascidos cujas mães tinham B12 ≥ 163 pmol/L.[14]

Os dados obtidos confirmaram que as baixas concentrações de B12 maternas estão associadas às alterações tanto no metabolismo materno como no neonatal. Porém, o resultado mais importante desse estudo foi a constatação de que os valores da razão SAM/SAH estavam baixos tanto nas parturientes com B12 ≤ 102 pmol/L como em seus recém-nascidos.[14] Esse resultado é importante e preocupante, pois concentrações elevadas de SAH inibem muitas metiltransferases dependentes de SAM, alterando o padrão de metilação do DNA.[89] Esses valores da razão no binômio mãe e recém-nascido são semelhantes àqueles encontrados no estudo com pacientes com anemia megaloblástica em razão da deficiência grave de B12, cujos valores da razão foram corrigidos após o tratamento com ciano-B12.[18] Desse modo, tais resultados sugerem que a B12 materna é importante para a manutenção das reações de metilação tanto no seu próprio metabolismo como no de seu concepto.

VITAMINA B6

Metabolismo

Vitamina B6 é um termo genérico usado para designar um grupo de vitaminas hidrossolúveis que compartilham a estrutura química 3-hidroxi-2-metil-5-hidroximetilpiridina. As várias formas da vitamina B6 diferem de acordo com o grupo químico ligado ao carbono 4 do anel piridina: piridoxina (PN), quando o radical é um álcool; piridoxamina (PM), quando o radical é uma amina; e piridoxal (PL), quando é um aldeído; e seus análogos fosforilados na posição 5'-hidroximetil, formando, respectivamente, piridoxina-5'-fosfato (PNP), piridoxamina-5'-fosfato (PMP) e piridoxal-5'-fosfato (PLP).[90]

Os vitâmeros fosforilados da vitamina B6 dependem de uma reação de desfosforilação para serem absorvidos,

Tabela 13.2 Concentração de vitaminas e de metabólitos no binômio mãe e recém-nascido

Variáveis	Parturientes	Recém-nascidos	Correlação (r)	P
B_{12} (pmol/L) (n = 117)	130,0 (122,0 – 138,0)	205,0 (186,0 – 225,0)	0,570	<0,001
Folato sérico (nmol/L) (n = 112)	12,9 (12,0 – 14,0)	30,9 (29,8 – 32,1)	0,409	<0,001
MMA (nmol/L) (n = 110)	200,0 (185,0 – 216,0)	308,0 (289,0 – 328,0)	0,693	<0,001
Homocisteína total (µmol/L) (n = 110)	6,5 (6,1 – 6,9)	5,8 (5,4 – 6,1)	0,753	<0,001
Cistationina (nmol/L) (n = 110)	197,0 (183,0 – 212,0)	314,0 (290,0 – 340,0)	0,728	<0,001
Ácido 2-metilcítrico (nmol/L) (n = 109)	115,0 (109,0 – 121,0)	177,0 (170,0 – 185,0)	0,478	<0,001
Cisteína (µmol/L) (n = 110)	191,0 (185,0 – 196,0)	181,0 (176,0 – 187,0)	0,432	<0,001
Metionina (µmol/L) (n = 110)	16,9 (16,2 – 17,5)	26,3 (25,4 – 27,3)	0,394	<0,001
Glicina (µmol/L) (n = 110)	190,0 (182,0 – 199,0)	281,0 (271,0 – 292,0)	0,474	<0,001
Serina (µmol/L) (n = 110)	136,0 (131,0 – 141,0)	155,0 (151,0 – 160,0)	0,417	<0,001
N, N-dimetilglicina (µmol/L) (n = 110)	2,8 (2,5 – 3,1)	3,7 (3,4 – 4,1)	0,936	<0,001
N-metilglicina (µmol/L) (n = 110)	0,6 (0,6 – 0,7)	0,9 (0,9 – 1,0)	0,826	<0,001
SAH (nmol/L) (n = 107)	22,0 (20,0 – 23,0)	52,0 (48,0 – 57,0)	0,219	0,023
SAM (nmol/L) (n = 105)	75,0 (70,0 – 81,0)	176,0 (164,0 – 190,0)	0,219	0,024
Razão SAM/SAH (n = 105)	3,5 (3,1 – 3,9)	3,4 (3,1 – 3,7)	0,288	<0,001

B_{12}: cobalamina; MMA: ácido metilmalônico; SAH: S-adenosil-homocisteína; SAM: S-adenosil-metionina. **Fonte:** Guerra-Shinohara et al.[14]

a qual é catalisada por uma fosfatase alcalina ligada à membrana da célula intestinal.[91] Já os vitâmeros não fosforilados são absorvidos por difusão passiva no jejuno e íleo. Em seguida, os vitâmeros chegam à circulação portal e alcançam o fígado, onde são fosforilados pela enzima *PL quinase* a seus respectivos 5'-fosfato ésteres. Além disso, PN, PM e PL, bem com as suas formas fosforiladas, podem ser convertidas entre elas por ação da *PMP oxigenase*. O principal produto do catabolismo de PLP é o ácido 4-piridóxico, que é formado pela *aldeído oxidase 1* no fígado e eliminado na urina.[92]

A PLP e, em menor extensão, a PMP agem como coenzimas em mais de 140 reações enzimáticas envolvidas na síntese e no catabolismo de aminoácidos,[4, 93] na síntese de aminas bioativas,[94, 95] na síntese e função da hemoglobina,[96] na glicogenólise[97] e no metabolismo de esfingolipídios.[98] Dando enfoque especial às reações de transferência de um carbono, o PLP age como cofator da enzima serina hidroximetiltransferase (SHMT), que catalisa a transferência de um grupamento metil da serina para o THF, formando glicina e 5,10-metileno-THF, um importante cofator utilizado para a síntese de timidina e metionina.[99] Outra enzima PLP-dependente é a CBS, que participa das reações de transulfuração da homocisteína, catalisando a condensação de uma molécula de serina com uma de homocisteína, formando cistationina.[5] Por fim, o PLP também é cofator para a betaína-homocisteína metiltransferase (BHMT), que catalisa uma das duas principais reações de remetilação da homocisteína, a transferência de um grupamento metil da betaína para a homocisteína, formando dimetilglicina e metionina.[100]

O marcador mais utilizado para avaliar as concentrações de vitamina B6 em humanos é o PLP plasmático. Concentrações de PLP no plasma maiores que 30 nmol/L são consideradas adequadas. A deficiência dessa vitamina é indicada por concentrações inferiores a 20 nmol/L, enquanto concentrações entre 20 e 30 nmol/L

indicam estado nutricional marginal relativo a essa vitamina.[101]

Estudos têm demonstrado o papel de baixas concentrações de PLP no plasma em um grande número de doenças, o que sugere que não apenas a deficiência evidente de vitamina B6, mas também a deficiência marginal, aumentam o risco de determinadas doenças crônicas. Estudos já demonstraram a relação entre a baixa concentração plasmática de PLP e marcadores inflamatórios,[102-104] artrite reumatoide[105] e aterosclerose.[106]

VITAMINA B2

Metabolismo

A riboflavina (vitamina B2) é uma vitamina hidrossolúvel que está presente em muitos alimentos, como leite e derivados, carnes, peixes, ovos, certas frutas e vegetais, especialmente os de folhas verde-escuras.[107] É uma vitamina bastante resistente ao calor, à oxidação e à acidez; entretanto, é muito sensível à luz. Quimicamente, pode ser descrita como uma estrutura tricíclica, contendo um anel isoaloxazina (grupo flavina) e uma cadeia lateral ribitil.[108] Pode se apresentar de três formas distintas: a riboflavina livre e dois cofatores, a FAD e a FMN, ou riboflavina-5'-fosfato.[109] Além disso, a riboflavina é o componente ativo de grupos prostéticos de muitas enzimas e proteínas conhecidas como flavoproteínas.[108]

Nos alimentos, a riboflavina aparece principalmente na forma de FAD, com menores quantidades de FMN e riboflavina livre. FAD e FMN precisam ser primeiramente convertidas para riboflavina livre por fosfatases antes da absorção, que ocorre principalmente no intestino delgado proximal, por transporte ativo.[107, 110] Dentro das células, ocorre a fosforilação da riboflavina para formar FMN; a maior parte desta é, posteriormente, convertida para FAD, a forma principal de riboflavina no plasma e nos tecidos.[107]

As formas biologicamente ativas mais importantes da riboflavina, FAD e FMN, funcionam como transportadores de elétrons e desempenham papéis centrais em numerosos processos metabólicos, participando de diversas reações de oxirredução no organismo. Atuam como grupos prostéticos de várias enzimas flavoproteínas que têm função central na produção de energia, catalisando a oxidação inicial de ácidos graxos e de vários intermediários do metabolismo da glicose e participando da cadeia de transporte de elétrons nas mitocôndrias. Desse modo, são fundamentais no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas.[107]

Em conjunto com as enzimas citocromo P-450, FAD e FMN participam da metabolização de drogas e toxina.[111] Além disso, agem como cofatores de diversas enzimas envolvidas no metabolismo de outras vitaminas do complexo B (folato, vitamina B6 e niacina).[112]

A FAD é necessária como cofator para a enzima MTHFR, que catalisa a conversão do 5-metil-THF para THF, desempenhando importante papel no ciclo do folato e no metabolismo da homocisteína.[113] A enzima MTRR, que ativa a MTR, também possui FAD como cofator.

Outra ligação entre a riboflavina com vitaminas do complexo B diz respeito à enzima piridoxina fosfato oxidase, que converte a vitamina B6 da alimentação em sua forma biologicamente ativa, o piridoxal fosfato, e tem como cofator a FMN.[112, 114] Além disso, FAD e FMN são cofatores importantes para diversas outras enzimas, como a glutationa redutase, a succinato desidrogenase, o complexo piruvato desidrogenase e a NADPH redutase.[115]

Em razão de toda a importância em diversos processos enzimáticos e metabólicos, a deficiência de riboflavina pode promover distúrbios no metabolismo intermediário, prejudicando o funcionamento de processos oxidativos, como a beta-oxidação e a geração de energia, as defesas contra radicais livres, o ciclo do folato e os processos de metilação.[107, 108] A deficiência grave pode, ainda, prejudicar o metabolismo da vitamina B6 e a conversão de triptofano em niacina.[114]

Outro evento que depende da ação de flavinas reduzidas é a mobilização de ferro da ferritina para os tecidos, que é um processo de redução.[107] Estudos *in vitro* e *in vivo* têm descrito um mecanismo no qual uma oxidorredutase dependente de FMN catalisa a remoção do ferro estocado como ferritina e o torna disponível para a utilização na síntese do heme.[116, 117] Foi demonstrado que os tecidos de ratos alimentados com dietas deficientes em riboflavina foram menos eficientes em mobilizar ferro da ferritina.[107]

ASSOCIAÇÕES ENTRE POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO, METABOLISMO DE UM CARBONO E ASPECTOS NUTRICIONAIS

Polimorfismos em genes envolvidos no metabolismo do ácido fólico

SNP em genes de transportadores de vitaminas (transportador de folato reduzido – RFC1 e transportador de B12 – TCN2) e de enzimas (MTHFR, MTR, MTRR, MTHFD1, CBS, DHFR etc.) podem estar associados a menores concentrações de vitaminas do complexo B ou a alterações no metabolismo de um carbono. As concentrações de folato podem estar reduzidas quando há alterações nos genes de enzimas (GCPII, MTHFR, MTHFD1 e DHFR) e/ou no *RFC1*, os quais estão envolvidos no seu metabolismo. Os SNP *RFC1* 80A>G

(rs1051266) e *GCPII* 1423 C>T (rs61886492) estão relacionados à absorção do folato, enquanto os SNP *MTHFR* 677C>T (rs1801133), *MTHFR* 1298A>C (rs1801131), *MTHFD1* 1958G>A (rs2236225) e deleção de 19 pares de base no *DHFR* (19pb del rs70991108) estão relacionados ao metabolismo do ácido fólico.

O SNP *RFC1* 80A>G (rs1051266), que resulta em substituição de uma histidina por uma arginina na posição 27 do RFC1, foi associado à redução da taxa de transporte de folato através da membrana celular, o que pode comprometer a absorção do folato proveniente da alimentação.[118] Foi descrito que crianças carreadoras do genótipo GG para o SNP *RFC1* 80A>G apresentaram maior risco de DFTN quando comparadas com aquelas carreadoras do genótipo AA (*odds ratio* – OR): 2,56; intervalo de confiança de 95% (IC 95%): 1,04 – 6,36).[119]

O SNP *GCPII* 1423 C>T (rs61886492) causa a substituição de uma histidina por uma tirosina na posição 475 na região catalítica da enzima GCPII e foi associado a menores concentrações de folato sérico e maiores de homocisteína total.[120] No entanto, essa associação não foi confirmada em outros estudos.[121-124]

O SNP *MTHFR* 677C>T (rs1801133) causa a troca de uma alanina por uma valina na posição 222 da enzima.[125] Esse SNP foi associado à redução da atividade da enzima MTHFR, uma vez que foi descrito que carreadores de genótipo TT apresentam aproximadamente redução de 65% e os indivíduos carreadores do genótipo heterozigoto CT de 30% na atividade da enzima quando comparados aos carreadores do genótipo homozigoto selvagem (CC).[125-127] Observou-se também que carreadores de genótipo TT apresentam maiores concentrações de homocisteína total.[125, 128, 129]

Alguns estudos mostraram que o efeito do SNP *MTHFR* 677C>T no aumento das concentrações de homocisteína total é evidenciado quando há deficiência de ácido fólico.[130, 131] Outros estudos mostraram que o 5-metil-THF aumenta a estabilidade da enzima MTHFR polimórfica e retarda a dissociação da MTHFR ao cofator FAD, mantendo assim sua atividade.[132, 133] Foi proposto também que a relação entre o polimorfismo *MTHFR* 677C>T e o risco de desenvolvimento de DFTN pode ser reduzida quando há consumo adequado de ácido fólico na gestação.[134]

O SNP *MTHFR* 677C>T foi associado à etiologia de doenças cardiovasculares,[135] de DFTN,[127, 136-139] às perdas fetais recorrentes[140] e à trombose.[141] No entanto, algumas metanálises mostraram que não há consenso sobre a associação entre o polimorfismo e a trombose,[142] às doenças cardiovasculares[143-145] e às perdas fetais recorrentes.[146]

O alelo T do polimorfismo *MTHFR* 677C>T foi associado ao acúmulo de THF formilado nos eritrócitos,[147] forma que pode gerar resultados falsamente aumentados em ensaios de quimioluminescência ou de radioisótopos que utilizam as proteínas do leite como ligantes ao folato, em comparação com os resultados de folato eritrocitário obtido em ensaios microbiológicos, especialmente em indivíduos carreadores de genótipo TT.[148] Esse fato deve ser considerado na análise de resultados conflitantes nos estudos que avaliam o folato eritrocitário pelos métodos citados.

O SNP *MTHFR* 1298A>C (rs1801131) ocasiona a substituição de um glutamato por uma alanina na posição 429 da enzima e está em desequilíbrio de ligação com o polimorfismo *MTHFR* 677C>T. Embora o SNP *MTHFR* 1298A>C tenha impacto na atividade da enzima MTHFR, não foram relatadas alterações nas concentrações da homocisteína total e de folato no plasma de indivíduos homo ou heterozigotos para essa variante, fenômeno que é geralmente evidente nos carreadores do genótipo homozigoto TT para o SNP *MTHFR* 677C>T. No entanto, foi descrito que indivíduos heterozigotos para ambos os polimorfismos possuem atividade reduzida da MTHFR, apresentando aumento significativo nas concentrações de homocisteína total e redução do folato no plasma, demonstrando um efeito aditivo entre os SNP.[140] Em estudo realizado com crianças portadoras de DFTN e suas mães e indivíduos saudáveis, foram observadas frequências semelhantes dos alelos MTHFR 677T e 1298C entre as crianças com DFTN e os controles, assim como entre as mães de crianças com DFTN e os controles. Entretanto, o haplótipo 677CT/1298AA foi associado a menores concentrações de B12 em crianças com DFTN.[136]

O SNP *MTHFD1* 1958G>A (rs2236225) causa a substituição de uma alanina por um glutamato na posição 653 do domínio sintase da enzima. O genótipo AA desse polimorfismo foi associado ao descolamento prematuro grave da placenta,[148] à perda fetal,[149] aos DFTN[150, 151] e à restrição de crescimento intraútero.[152]

Dentre os polimorfismos encontrados no gene da DHFR, a deleção de 19 pb (*DHFR* 19bpdel, rs70991108) no íntron 1 foi associada à remoção do sítio de ligação para o fator de transcrição Sp1, o que influencia a regulação da expressão gênica.[29] A deleção foi associada ao maior risco de desenvolvimento de DFTN[30] e ao risco aumentado de câncer de mama entre as mulheres que recebem suplementação de ácido fólico.[29] O genótipo homozigoto para *DHFR* 19bpdel foi associado a maior risco de nascimento de criança com retinoblastoma unilateral (OR: 3,78; IC 95%: 1,89-7,55; P < 0,001).[34]

Polimorfismos em genes de proteínas ou enzimas envolvidas no metabolismo da cobalamina

Embora várias proteínas estejam relacionadas ao transporte da B12,[76] SNP no gene da TCN2 são os mais

estudados em razão de seus efeitos biológicos. Vários polimorfismos foram descritos no gene da TCN2: 67A>G (presente no éxon 2), 280G>A (éxon 3), 701A>G (éxon 5), 776C>G (éxon 6), 1043C>T (éxon 7) e 1196G>A (éxon 8).[81, 153]

O SNP *TCN2* 776C>G (rs1801198) causa a substituição de uma prolina por uma arginina na posição 259 da TCN2 e foi relacionado a menores concentrações de holo-TC no sangue. Mostrou-se que mulheres carreadoras de genótipo homozigoto variante (776GG) para o SNP *TCN2* 776C>G apresentaram menores concentrações de holo-TC ($34,8 \pm 24,9$ pmol/L) quando comparadas àquelas com genótipo heterozigoto ($48,8 \pm 33,2$ pmol/L) e àquelas com genótipo homozigoto selvagem ($61,8 \pm 35,6$ pmol/L).[154] Também foram encontradas maiores concentrações de holo-TC em idosos com genótipo homozigoto selvagem (776CC) para o SNP *TCN2* 776C>G em comparação com as concentrações de holo-TC em carreadores de genótipos 776CG e 776GG.[155]

O SNP *TCN2* 67A>G (rs9606756) causa a troca de uma valina por uma isoleucina na posição 23 da proteína. A frequência do alelo *TCN2* 67G variou entre 13 e 14% em populações de indivíduos saudáveis[81, 153] e 14% em mães irlandesas de crianças com DFTN.[156] Em um estudo conduzido com 190 pacientes que apresentavam cardiopatia ou alterações vasculares, observou-se que indivíduos com genótipos *TCN2* 67AA e 67AG apresentavam valores de homocisteína total maiores que indivíduos com genótipo 67GG.[153]

A variação *TCN2* 701A>G (rs145641025) causa a troca de uma glutamina por uma arginina na posição 234 da proteína.[157] Li et al.[158] sugerem que a presença do alelo G pode estar relacionada com a diminuição de função da TCN2, em razão da substituição de um aminoácido neutro por um resíduo de arginina. Segundo esses autores, a substituição de um aminoácido neutro alteraria a estabilidade conformacional do sítio de ligação para B12 na TCN2, impedindo essa ligação. Assim, a B12 não seria absorvida pelas células, causando deficiência da vitamina. No entanto, essa variação é muito rara, não sendo encontrada em indivíduos saudáveis, mães e crianças com DFTN nem em pacientes com doença vascular (coronariana, periférica e cerebral).[81, 153, 159] A variação *TCN2* 701A>G também não foi encontrada em estudo realizado com 369 mulheres brasileiras.[160]

Polimorfismos em genes de proteínas envolvidas no metabolismo da vitaminas B6 e B2

Visando investigar os fatores genéticos que influenciam as concentrações de vitamina B6 circulante, estudos de associação ampla do genoma (GWAS) foram realizados em diversas populações. Convencionalmente, nesse tipo de estudo, considera-se associação significante quando o p valor é menor que 5×10^{-8}.[161] Um dos estudos foi realizado com duas populações distintas da Toscana, Itália (uma de idosos e outra de adultos saudáveis). Observou-se que o SNP rs4654748 no gene *NBPF3* foi associado às concentrações de vitamina B6 ($p = 8,3 \times 10^{-18}$), sendo a presença do alelo C associada a uma diminuição de 1,45 ng/mL nas concentrações dessa vitamina.[162] Outro GWAS realizado com indivíduos com infarto cerebral provenientes dos Estados Unidos, Canadá e Escócia demonstrou associação entre as variantes rs1697421 ($p = 7,06 \times 10^{-10}$) e rs1780316 ($p = 2,25 \times 10^{-8}$) no gene da fosfatase alcalina (*ALPL)* e as concentrações de PLP.[163] Um terceiro estudo, realizado com mulheres americanas, mostrou que a variante rs1256335 no gene *ALPL* foi também associada às concentrações de PLP ($p = 1,40 \times 10^{-15}$), e os indivíduos homozigotos para a variante apresentaram maiores concentrações plasmáticas de PLP que os carreadores do alelo ancestral.[164] Recentemente, as variantes rs1697421 e rs1256335 também foram associadas às concentrações de PLP em adultos jovens provenientes da Irlanda (respectivamente, $p = 3,40 \times 10^{-11}$, e $p = 4,38 \times 10^{-14}$), juntamente com outros sete polimorfismos no gene *ALPL*.[165]

Dessa forma, pode-se afirmar que o gene *ALPL* provavelmente possui papel importante na manutenção do *status* da vitamina B6. Sabe-se que indivíduos com hipofosfatasia, condição causada por mutações inativantes no gene *ALPL*, apresentam concentrações plasmáticas de PLP elevadas,[166, 167] e que a fosfatase alcalina é capaz de desfosforilar a PLP extracelular.[91]

A presença do alelo T, relativo ao SNP *MTHFR* 677C>T, codifica uma enzima com menor afinidade a esse cofator, necessitando assim de maior concentração de FAD para a atividade catalítica da MTHFR.[132, 168] Em estudo usando MTHFR recombinante, demonstrou-se que o aumento de riboflavina resulta em melhora da atividade dessa enzima, promovendo redução das concentrações de homocisteína total.[132]

Polimorfismos em genes envolvidos no metabolismo da homocisteína

Alterações nos genes *MTR* e *MTRR* podem acarretar redução nas atividades das enzimas e promover o acúmulo de homocisteína total no plasma.[169] O SNP *MTR* 2756A>G (rs1805087) causa a substituição de glicina por ácido aspártico na posição 919 da enzima.[170] Essa substituição ocorre próxima ao sítio de ligação da metil-B12 na MTR,[171] reduzindo a atividade da enzima.[170] Foi também

sugerido que essa alteração de aminoácidos modifica a estrutura secundária da proteína MTR, acarretando consequências funcionais na enzima.[172] Esse polimorfismo foi associado ao maior risco de desenvolvimento de espinha bífida[173] e de síndrome de Down.[174] O genótipo *MTR* 2756AA foi encontrado em cerca de 60 e 64%, respectivamente, da população caucasiana da Irlanda[175] e de gestantes no Brasil,[86] e foi relacionado ao modesto, mas significante, aumento das concentrações plasmáticas de homocisteína total.

Já o SNP *MTRR* 66A>G (rs1801394) causa a substituição de uma isoleucina por uma metionina na posição 22 da enzima.[176] Esse polimorfismo foi associado ao maior risco de espinha bífida[173, 176-178] e de síndrome de Down.[179, 180] Carreadores de genótipo *MTRR* 66AA apresentaram aumento significativo das concentrações de homocisteína total quando comparados com carreadores dos demais genótipos,[169] porém outros estudos não confirmaram esse resultado.[176, 181] Por sua vez, o genótipo materno *MTRR* 66GG foi associado às baixas concentrações de B12, aumentando o risco para DFTN em recém-nascidos.[176]

Já no gene da enzima cistationina beta sintase (CBS), a inserção de 68 pares de bases (*CBS* 844ins68, rs1789953) no éxon 8 não foi associada às alterações nas concentrações de homocisteína total em vários estudos.[182-184] No entanto, essa variação foi identificada como fator de risco para doença arterial.[185] A combinação entre o alelo variante da *CBS* 844ins68 e o genótipo *MTHFR* 677TT foi associada ao maior risco de trombose[186] e ao início precoce da doença oclusiva arterial e venosa.[187] Um estudo brasileiro realizado em Campinas mostrou que as concentrações de homocisteína total estavam baixas em crianças carreadoras de genótipos 68WI/677TT quando comparadas com crianças carreadoras de genótipos 68WW/677TT para os polimorfismos *CBS* 844ins68 e *MTHFR* 677C>T.[183]

INFLUÊNCIA DAS VITAMINAS NOS EVENTOS EPIGENÉTICOS

Atualmente, está bem estabelecida a relação entre alterações epigenéticas, especialmente a metilação aberrante do DNA, e uma série de doenças crônicas não transmissíveis, incluindo câncer, síndrome metabólica, doenças cardiovasculares e autoimunes.[188-194] A metilação do DNA é a modificação epigenética mais amplamente estudada e está intimamente ligada ao metabolismo do um carbono, que é dependente de diversas enzimas, micronutrientes e cofatores. As vitaminas do complexo B estão intimamente envolvidas nesse processo, em especial o folato como principal doador de grupamentos metil (5-metil-THF), mas também a vitamina B6 (atividade da serina hidroximetiltransferase), a vitamina B12 (função da metionina sintase) e a riboflavina (estabilidade da MTHFR).[102, 195-197]

Como visto anteriormente, no ciclo do folato, os grupamentos metil são transferidos do 5-metil-THF até SAM. Por sua vez, a SAM doa o grupamento metil para várias reações de metilação, incluindo metilação de DNA, RNA, proteínas, neurotransmissores, fosfolipídios e histonas.[1, 2, 198] No processo de metilação do DNA, enzimas DNA metiltransferases desempenham papel fundamental, transferindo grupamentos metil da SAM para o carbono 5 das bases citosinas, formando 5-metilcitosinas e, dessa forma, metilando o DNA.[195] As DNA metiltransferases são responsáveis pelo estabelecimento de um padrão original de metilação e pela manutenção desses padrões ao longo das diversas divisões celulares.[1]

A manutenção de padrões normais de metilação do DNA é crucial para a homeostase celular, uma vez que esse processo regula a expressão gênica e a integridade de genes.[2] A taxa de metilação do DNA em regiões promotoras de genes é determinante importante da expressão gênica, tendo relação inversa, ou seja, quanto mais metilado, menos expresso é o gene.[199]

Por outro lado, quando ocorre redução da ingestão do folato na alimentação, ocorre também redução das concentrações de SAM, e as concentrações plasmáticas e celulares de homocisteína aumentam.[200,201] Essa hiper-homocisteinemia desloca a reação para a formação de SAH. Nessas situações, além de menor concentração de SAM, ocorre aumento de SAH, que é um inibidor da atividade das metiltransferases. Esse aumento tem sido associado com hipometilação global do DNA.[201-203]

Padrões alterados de metilação do DNA são uma característica importante do processo carcinogênico e um achado comum no câncer.[26, 204] Essas modificações favorecem o aparecimento de neoplasias, na medida em que promovem a hipometilação de oncogenes, ocasionando sua ativação e, simultaneamente, a hipermetilação de sítios específicos, o que pode contribuir para a inativação de genes supressores de tumores, resultando no seu silenciamento.[1,205,206]

Além disso, a metilação do DNA é um processo importantíssimo para o desenvolvimento embrionário, já que durante esse período ocorre programação dos padrões de metilação, sendo estabelecidas marcações epigenéticas individuais no genoma (*imprinting*), que são mantidas para a posterioridade.[207-209] Assim, o estado nutricional durante essa fase pode ter influência sobre o fenótipo na fase adulta.[210]

Dessa forma, tanto a deficiência como o excesso de doadores de grupamentos metil, necessários para as reações de metilação, podem alterar os padrões epigenéticos. Essas modificações podem persistir por gerações e longos períodos e alterar o perfil de expressão gênica do organismo, causando mudanças fenotípicas[187] que podem afetar o estado de saúde do indivíduo.

Um aspecto técnico a ser discutido quando se faz a comparação de resultados de diferentes estudos é o fato de a metilação do DNA ser tecido-específica. Observou-se, por exemplo, um padrão de metilação diferente da região promotora do gene *SERPINB5* em amostras de tecido placentário e células sanguíneas periféricas de gestantes dos primeiro e terceiro trimestres.[211]

Além disso, existem diferentes métodos para avaliar o padrão de metilação do DNA, os quais podem apresentar vantagens e desvantagens. A avaliação da metilação global do DNA, por exemplo, é amplamente utilizada; porém, cerca de 60 a 70% das ilhas CpG presentes no DNA não estão localizadas em regiões promotoras. Avaliar apenas algumas ilhas CpG da região promotora de determinado gene (*quantitative methylation-specific polymerase chain reaction* – qMSP) também pode não representar a metilação do DNA como um todo, uma vez que um determinado nutriente pode hipermetilar um gene e hipometilar outro. De forma geral, a metodologia adotada pode variar dependendo do objetivo do estudo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As vitaminas do complexo B desempenham papel vital no organismo humano, estando algumas delas implicadas com o metabolismo de um carbono. Com isso, esses nutrientes estão ligados, direta ou indiretamente, à síntese e ao reparo de ácidos nucleicos e a todas as reações de metilação do organismo, com destaque para a metilação do DNA. A ligação do metabolismo do um carbono com a metilação do DNA mostra a influência dessas vitaminas na regulação da expressão gênica, o que pode impactar em mecanismos de controle de doenças como o câncer, bem como a sua possível contribuição para a programação de padrões de metilação na fase embrionária.

Uma vez que a deficiência dessas vitaminas tem sido associada a consequências sérias, como complicações materno-fetais, doenças cardiovasculares e neurológicas, câncer, entre outras, é importante compreender a influência que polimorfismos em genes de enzimas fundamentais do metabolismo do carbono possam desempenhar nas concentrações celulares dessas vitaminas. Da mesma forma, maior importância deve ser dada às condições que levam à deficiência desses nutrientes, como ocorre durante gestação, lactação e crescimento.

Por fim, estudos têm demonstrado o aumento considerável das concentrações de folato em brasileiros após a implementação da fortificação obrigatória de farinhas com ácido fólico. Portanto, são necessários novos estudos a fim de investigar as políticas de fortificação de alimentos com essa vitamina e como elas podem impactar no metabolismo do carbono e nos mecanismos de metilação do DNA e no desenvolvimento de doenças crônicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Crider KS et al. Folate and DNA methylation: a review of molecular mechanisms and the evidence for folate's role. Adv Nutr. 2012;3(1):21-38.
2. Choi SW, Mason JB. Folate status: effects on pathways of colorectal carcinogenesis. J Nutr. 2002;132(8):2413S-2418S.
3. Stabler SP et al. Elevation of serum cystathionine levels in patients with cobalamin and folate deficiency. Blood. 1993;81(12):3404-13.
4. Selhub J. Homocysteine metabolism. Annu Rev Nutr. 1999;19:217-46.
5. Selhub J, Miller JW. The pathogenesis of homocysteinemia: interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine. Am J Clin Nutr. 1992;55(1):131-38.
6. Ludwig ML, Matthews RG. Structure-based perspectives on B12-dependent enzymes. Annu Rev Biochem. 1997;66:269-313.
7. Selhub J et al. B vitamins, homocysteine, and neurocognitive function in the elderly. Am J Clin Nutr. 2000;71(2):614S-620S.
8. Chanarin I et al. Cobalamin and folate: recent developments. J Clin Pathol. 1992;45(4):277-83.
9. Chanarin I. Megaloblastic anaemia, cobalamin, and folate. J Clin Pathol. 1987;40(9):978-84.
10. Luzzatto L, Falusi AO, Joju EA. Uracil in DNA in megaloblastic anemia. N Engl J Med. 1981;305(19):1156-57.
11. Wickremasinghe RG, Hoffbrand AV. Reduced rate of DNA replication fork movement in megaloblastic anemia. J Clin Invest. 1980;65(1):26-36.
12. Das KC, Herbert V. Vitamin B12-folate interrelations. Clin Haematol. 1976;5(3):697-745.
13. Selhub J et al. Folate-vitamin B-12 interaction in relation to cognitive impairment, anemia, and biochemical indicators of vitamin B-12 deficiency. Am J Clin Nutr. 2009;89(2):702S-6S.
14. Guerra-Shinohara EM et al. Low ratio of S-adenosylmethionine to S-adenosylhomocysteine is associated with vitamin deficiency in Brazilian pregnant women and newborns. Am J Clin Nutr. 2004;80(5):1312-21.
15. Guerra-Shinohara E et al. Relationship between total homocysteine and folate levels in pregnant women and their newborn babies according to maternal serum levels of vitamin B-12. Bjog-an International Journal of Obstetrics and Gynaecology. 2002;109(7):784-91.
16. Lövblad K et al. Retardation of myelination due to dietary vitamin B12 deficiency: cranial MRI findings. Pediatr Radiol. 1997;27(2):155-58.
17. Lindenbaum J et al. Neuropsychiatric disorders caused by cobalamin deficiency in the absence of anemia or macrocytosis. N Engl J Med. 1988;318(26):1720-28.
18. Guerra-Shinohara EM et al. Elevated serum S-adenosylhomocysteine in cobalamin-deficient megaloblastic anemia. Metabolism-Clinical and Experimental. 2007;56(3):339-47.

19. Stabler SP et al. Elevation of total homocysteine in the serum of patients with cobalamin or folate deficiency detected by capillary gas chromatography-mass spectrometry. J Clin Invest. 1988;81(2):466-74.
20. Green R. Folate, cobalamin, and megaloblastic anemias. In: Kaushansky K, Lichtman MA et al. (ed.). Williams Hematology. 8.ed. New York: McGraw Hill; 2010.
21. Deacon R et al. Marrow cells from patients with untreated pernicious anaemia cannot use tetrahydrofolate normally. Br J Haematol. 1980;46(4):523-28.
22. Huennekens FM. Folic acid coenzymes in the biosynthesis of purines and pyrimidines. Vitam Horm. 1968;26:375-94.
23. Crider KS, Bailey LB, Berry RJ. Folic acid food fortification-its history, effect, concerns, and future directions. Nutrients. 2011;3(3):370-84.
24. Eichholzer M, Tönz O, Zimmermann R. Folic acid: a public-health challenge. Lancet. 2006;367(9519):1352-61.
25. Sanderson P et al. Folate bioavailability: UK Food Standards Agency workshop report. Br J Nutr. 2003;90(2):473-79.
26. Kim YI. Folate and colorectal cancer: an evidence-based critical review. Mol Nutr Food Res. 2007;51(3):267-92.
27. Zhao R, Matherly LH, Goldman ID. Membrane transporters and folate homeostasis: intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues. Expert Rev Mol Med. 2009;11:e4.
28. Shane B. Folate chemistry and metabolism. In: Baile LB (ed.). Folate in health and disease. v.1. New York: Marcel Dekker; 1995.
29. Xu X et al. A functional 19-base pair deletion polymorphism of dihydrofolate reductase (DHFR) and risk of breast cancer in multivitamin users. Am J Clin Nutr. 2007;85(4):1098-102.
30. Johnson WG et al. New 19 bp deletion polymorphism in intron-1 of dihydrofolate reductase (DHFR): a risk factor for spina bifida acting in mothers during pregnancy? Am J Med Genet A. 2004;124A(4):339-45.
31. Carroll N et al. Analysis of the MTHFD1 promoter and risk of neural tube defects. Hum Genet. 2009;125(3):247-56.
32. Parle-McDermott A et al. A polymorphism in the MTHFD1 gene increases a mother's risk of having an unexplained second trimester pregnancy loss. Mol Hum Reprod. 2005;11(7):477-80.
33. Hum DW et al. Primary structure of a human trifunctional enzyme. Isolation of a cDNA encoding methylenetetrahydrofolate dehydrogenase-methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase-formyltetrahydrofolate synthetase. J Biol Chem. 1988;263(31):15946-50.
34. Orjuela MA et al. Risk of retinoblastoma is associated with a maternal polymorphism in dihydrofolatereductase (DHFR) and prenatal folic acid intake. Cancer. 2012;118(23):5912-19.
35. Melnyk S et al. Uracil misincorporation, DNA strand breaks, and gene amplification are associated with tumorigenic cell transformation in folate deficient/repleted Chinese hamster ovary cells. Cancer Lett. 1999;146(1):35-44.
36. James SJ, Basnakian AG, Miller BJ. In vitro folate deficiency induces deoxynucleotide pool imbalance, apoptosis, and mutagenesis in Chinese hamster ovary cells. Cancer Res. 1994;54(19):5075-80.
37. Blount BC et al. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. Proc Natl Acad Sci USA. 1997;94(7):3290-95.
38. Dianov GL et al. Repair of uracil residues closely spaced on the opposite strands of plasmid DNA results in double-strand break and deletion formation. Mol Gen Genet. 1991;225(3):448-52.
39. Shane B. Folate status assessment history: implications for measurement of biomarkers in NHANES. Am J Clin Nutr. 2011;94(1):337S-342S.
40. Piyathilake CJ, Robinson CB, Cornwell P. A practical approach to red blood cell folate analysis. Anal Chem Insights. 2007;2:107-10.
41. van der Linden IJ et al. Genetic variation in genes of folate metabolism and neural-tube defect risk. Proc Nutr Soc. 2006;65(2):204-15.
42. Papa A, DE-Stefano V, Danese S, Chiusolo P, Persichilli S, Casorelli I et al. Hyperhomocysteinemia and prevalence of polymorphisms of homocysteine metabolism – related enzymes in patients with inflammatory bowel disease. Am J Gastroenterol. 2001;96:2677-82.
43. Ray JG, Laskin CA. Folic acid and homocyst(e)ine metabolic defects and the risk of placental abruption, pre-eclampsia and spontaneous pregnancy loss: A systematic review. Placenta. 1999;20(7):519-29.
44. Bower C, Stanley FJ. Dietary folate as a risk factor for neural-tube defects: evidence from a case-control study in Western Australia. Med J Aust. 1989;150(11):613-19.
45. Centers for Disease Control. Use of folic acid for prevention of spina bifida and other neural tube defects--1983-1991. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 1991;40(30):513-16.
46. Liu Z et al. Mild depletion of dietary folate combined with other B vitamins alters multiple components of the Wnt pathway in mouse colon. J Nutr. 2007;137(12):2701-08.
47. Jacob RA et al. Moderate folate depletion increases plasma homocysteine and decreases lymphocyte DNA methylation in postmenopausal women. J Nutr. 1998;128(7):1204-12.
48. Pogribny IP et al. Breaks in genomic DNA and within the p53 gene are associated with hypomethylation in livers of folate/methyl-deficient rats. Cancer Res. 1995;55(9):1894-901.
49. Motiwala T et al. Suppression of the protein tyrosine phosphatase receptor type O gene (PTPRO) by methylation in hepatocellular carcinomas. Oncogene. 2003;22(41):6319-31.
50. Pogribny IP, James SJ. De novo methylation of the p16INK4A gene in early preneoplastic liver and tumors induced by folate/methyl deficiency in rats. Cancer Lett. 2002;187(1-2):69-75.
51. Jhaveri MS, Wagner C, Trepel JB. Impact of extracellular folate levels on global gene expression. Mol Pharmacol. 2001;60(6):1288-95.
52. Casas JP et al. Homocysteine and stroke: evidence on a causal link from mendelian randomisation. Lancet. 2005;365(9455):224-32.
53. Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. BMJ. 2002;325(7374):1202.
54. Smith AD et al. Homocysteine-lowering by B vitamins slows the rate of accelerated brain atrophy in mild cognitive impairment: a randomized controlled trial. PLoS One. 2010;5(9):e12244, 2010.
55. Jager CA et al. Cognitive and clinical outcomes of homocysteine-lowering B-vitamin treatment in mild cognitive impairment: a randomized controlled trial. Int J Geriatr Psychiatry. 2012;27(6):592-600.
56. Seshadri S et al. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. N Engl J Med. 2002;346(7):476-83.
57. Brasil. Resolução RDC n.344, de 13 de dezembro de 2002. 2002.
58. Smith AD, Kim YI, Refsum H. Is folic acid good for everyone? Am J Clin Nutr. 2008;87(3):517-33.
59. Bailey SW, Ayling JE. The extremely slow and variable activity of dihydrofolate reductase in human liver and its implications for high folic acid intake. Proc Natl Acad Sci USA. 2009;106(36):15424-29.
60. Castillo-Lancellotti C, Tur JA, Uauy R. Impact of folic acid fortification of flour on neural tube defects: a systematic review. Public Health Nutr. 2012;16(5):1-11.
61. Wals P et al. Reduction in neural-tube defects after folic acid fortification in Canada. N Engl J Med. 2007;357(2):135-42.

62. Honein MA et al. Impact of folic acid fortification of the US food supply on the occurrence of neural tube defects. JAMA. 2001;285(23):2981-86.
63. Britto JC, Cançado R, Guerra-Shinohara EM. Concentrations of blood folate in Brazilian studies prior to and after fortification of wheat and cornmeal (maize flour) with folic acid: a review. Rev Bras Hematol Hemoter. 2014;36(4):275-86.
64. Houghton LA, Yang J, O'Connor DL. Unmetabolized folic acid and total folate concentrations in breast milk are unaffected by low-dose folate supplements. Am J Clin Nutr. 2009;89(1):216-20.
65. Kalmbach RD et al. Circulating folic acid in plasma: relation to folic acid fortification. Am J Clin Nutr. 2008;88(3):763-68.
66. Mason JB et al. A temporal association between folic acid fortification and an increase in colorectal cancer rates may be illuminating important biological principles: a hypothesis. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2007;16(7):1325-29.
67. Wright AJ, Dainty JR, Finglas PM. Folic acid metabolism in human subjects revisited: potential implications for proposed mandatory folic acid fortification in the UK. Br J Nutr. 2007;98(4):667-75.
68. Troen AM et al. Unmetabolized folic acid in plasma is associated with reduced natural killer cell cytotoxicity among postmenopausal women. J Nutr. 2006;136(1):189-94.
69. Imai K et al. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. Lancet. 2000;356(9244): 1795-99.
70. Allegra CJ et al. Inhibition of phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide transformylase by methotrexate and dihydrofolic acid polyglutamates. Proc Natl Acad Sci USA. 1985;82(15):4881-85.
71. Matthews RG, Baugh CM. Interactions of pig liver methylenetetrahydrofolate reductase with methylenetetrahydropteroylpolyglutamate substrates and with dihydropteroylpolyglutamate inhibitors. Biochemistry. 1980;19(10):2040-45.
72. Scott JM et al. Pathogenesis of subacute combined degeneration: a result of methyl group deficiency. Lancet. 1981;2(8242):334-37.
73. Morris MS et al. Folate and vitamin B-12 status in relation to anemia, macrocytosis, and cognitive impairment in older Americans in the age of folic acid fortification. Am J Clin Nutr. 2007;85(1):193-200.
74. Morris MC et al. Dietary folate and vitamin B12 intake and cognitive decline among community-dwelling older persons. Arch Neurol. 2005;62(4):641-45.
75. Chen LH et al. Human methionine synthase. cDNA cloning, gene localization, and expression. J Biol Chem. 1997;272(6):3628-34.
76. Nielsen MJ et al. Vitamin B12 transport from food to the body's cells – a sophisticated, multistep pathway. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2012;9(6):345-54.
77. Savage DG et al. Sensitivity of serum methylmalonic acid and total homocysteine determinations for diagnosing cobalamin and folate deficiencies. Am J Med. 1994;96(3):239-46.
78. Allen RH et al. Metabolic abnormalities in cobalamin (vitamin B12) and folate deficiency. FASEB J. 1993;7(14):1344-53.
79. Stabler SP et al. Assay of methylmalonic acid in the serum of patients with cobalamin deficiency using capillary gas chromatography-mass spectrometry. J Clin Invest. 1986;77(5):1606-12.
80. Clarke R et al. Detection of vitamin B12 deficiency in older people by measuring vitamin B12 or the active fraction of vitamin B12, holotranscobalamin. Clin Chem. 2007;53(5):963-70.
81. Afman LA et al. Single nucleotide polymorphisms in the transcobalamin gene: relationship with transcobalamin concentrations and risk for neural tube defects. Eur J Hum Genet. 2002;10(7):433-38.
82. Herrmann W et al. Vitamin B-12 status, particularly holotranscobalamin II and methylmalonic acid concentrations, and hyperhomocysteinemia in vegetarians. Am J Clin Nutr. 2003;78(1):131-36.
83. Lindgren A et al. Holotranscobalamin - a sensitive marker of cobalamin malabsorption. Eur J Clin Invest. 1999;29(4):321-29.
84. Nexo E et al. Quantification of holo-transcobalamin, a marker of vitamin B12 deficiency. Clin Chem. 2002;48(3):561-62.
85. Refsum H, Smith AD. Low vitamin B-12 status in confirmed Alzheimer's disease as revealed by serum holotranscobalamin. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2003;74(7):959-61.
86. Barbosa PR et al. Evaluation of nutritional and genetic determinants of total homocysteine, methylmalonic acid and S-adenosylmethionine/S-adenosylhomocysteine values in Brazilian childbearing-age women. Clinica Chimica Acta. 2008;388 (1-2):139-47.
87. Allen RH et al. Elevation of 2-methylcitric acid I and II levels in serum, urine, and cerebrospinal fluid of patients with cobalamin deficiency. Metabolism. 1993;42(8):978-88.
88. Allen RH, Stabler SP, Lindenbaum J. Serum betaine, N,N-dimethylglycine and N-methylglycine levels in patients with cobalamin and folate deficiency and related inborn errors of metabolism. Metabolism. 1993;42(11):1448-60.
89. Clarke S, Banfield K. S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. In: Clarke S, Banfield K. (ed.). Homocysteine in health and disease. United Kindong: Cambridge University Press; 2001.
90. Gregory JF III. Vitamins. In: Fennema OR (ed.). Food chemistry. 3.ed. New York: Marcel Dakker; 1996.
91. Fedde KN, Whyte MP. Alkaline phosphatase (tissue-nonspecific isoenzyme) is a phosphoethanolamine and pyridoxal-5'-phosphate ectophosphatase: normal and hypophosphatasia fibroblast study. Am J Hum Genet. 1990;47(5):767-75.
92. Galluzzi L et al. Effects of vitamin B6 metabolism on oncogenesis, tumor progression and therapeutic responses. Oncogene. 2013;32(42):4995-5004.
93. Tucker KL et al. Breakfast cereal fortified with folic acid, vitamin B-6, and vitamin B-12 increases vitamin concentrations and reduces homocysteine concentrations: a randomized trial. Am J Clin Nutr. 2004;79(5):805-11.
94. Manegold C et al. Aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency: clinical features, drug therapy and follow-up. J Inherit Metab Dis. 2009;32(3):371-80.
95. Toney MD. Reaction specificity in pyridoxal phosphate enzymes. Arch Biochem Biophys. 2005;433(1):279-87.
96. Nandi DL. Delta-aminolevulinic acid synthase of rhodopseudomonas spheroides. Binding of pyridoxal phosphate to the enzyme. Arch Biochem Biophys. 1978;188(2):266-71.
97. Chang YC, Scott RD, Graves DJ. Function of pyridoxal 5'-phosphate in glycogen phosphorylase: a model study using 6-fluoro-5'-deoxypyridoxal- and 5'-deoxypyridoxal-reconstituted enzymes. Biochemistry. 1987;26(2):360-67.
98. Bourquin F, Capitani G, Grütter MG. PLP-dependent enzymes as entry and exit gates of sphingolipid metabolism. Protein Sci. 2011;20(9):1492-508.
99. Appaji Rao N et al. Structure-function relationship in serine hydroxymethyltransferase. Biochim Biophys Acta. 2003;1647 (1-2):24-29.
100. Wu XY, Lu L. Vitamin B6 deficiency, genome instability and cancer. Asian Pac J Cancer Prev. 2012;13(11):5333-38.
101. Silva VR et al. Vitamin B6. In: Ross C, Caballero B et al (ed.). Modern nutrition in health and disease. 11.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2012.

102. Abbenhardt C et al. Biomarkers of one-carbon metabolism are associated with biomarkers of inflammation in women. J Nutr. 2014;144(5):714-21.
103. Chiang EP et al. Inflammation causes tissue-specific depletion of vitamin B6. Arthritis Res Ther. 2005;7(6):R1254-62.
104. Roubenoff R et al. Abnormal vitamin B6 status in rheumatoid cachexia. Association with spontaneous tumor necrosis factor alpha production and markers of inflammation. Arthritis Rheum. 1995;38(1):105-09.
105. Chiang EP et al. Plasma pyridoxal 5'-phosphate concentration is correlated with functional vitamin B-6 indices in patients with rheumatoid arthritis and marginal vitamin B-6 status. J Nutr. 2003;133(4):1056-59.
106. Willerson JT, Ridker PM. Inflammation as a cardiovascular risk factor. Circulation. 2004;109(21 Suppl 1):II2-10.
107. Powers HJ. Riboflavin (vitamin B-2) and health. Am J Clin Nutr. 2003;77(6):1352-60.
108. Monteiro MC, Perrone D. Chemistry and biochemistry of riboflavin and related compounds. In: Preedy VR (ed.). B Vitamins and folate: chemistry, analysis, function and effects. Cambridge: RSC Publishing; 2013.
109. Petteys BJ, Frank EL. Rapid determination of vitamin B_2(riboflavin) in plasma by HPLC. Clin Chim Acta. 2011;412(1-2):38-43.
110. Said HM, Mohammed ZM. Intestinal absorption of water-soluble vitamins: an update. Curr Opin Gastroenterol. 2006;22(2):140-46.
111. Powers HJ. Current knowledge concerning optimum nutritional status of riboflavin, niacin and pyridoxine. Proc Nutr Soc. 1999;58(2):435-40.
112. Hoey L, McNulty H, Strain JJ. Studies of biomarker responses to intervention with riboflavin: a systematic review. Am J Clin Nutr. 2009;89(6):1960S-1980S.
113. McNulty H et al. Riboflavin lowers homocysteine in individuals homozygous for the MTHFR 677C->T polymorphism. Circulation. 2006;113(1):74-80.
114. McCormick DB. Two interconnected B vitamins: riboflavin and pyridoxine. Physiol Rev. 1989;69(4):1170-98.
115. Hassan I, Chibber S, Naseem I. Vitamin B: a promising adjuvant in cisplatin based chemoradiotherapy by cellular redox management. Food Chem Toxicol. 2013;59:715-23.
116. Ulvik RJ. Ferritin iron as substrate for synthesis of protoheme in intact rat liver mitochondria. FEBS Lett. 1981;132(2):281-84.
117. Sirivech S, Driskell J, Frieden E. NADH-FMN oxidoreductase activity and iron content of organs from riboflavin and iron-deficient rats. J Nutr. 1977;107(5):739-45.
118. Chango A et al. A polymorphism (80G->A) in the reduced folate carrier gene and its associations with folate status and homocysteinemia. Mol Genet Metab. 2000;70(4):310-15.
119. Pei L et al. Reduced folate carrier gene is a risk factor for neural tube defects in a Chinese population. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2005;73(6):430-33.
120. Devlin AM et al. Glutamate carboxypeptidase II: a polymorphism associated with lower levels of serum folate and hyperhomocysteinemia. Hum Mol Genet. 2000;9(19): 2837-44.
121. Devlin AM et al. Interactions among polymorphisms in folate-metabolizing genes and serum total homocysteine concentrations in a healthy elderly population. Am J Clin Nutr. 2006;83(3):708-13.
122. Chen J et al. Polymorphisms in the one-carbon metabolic pathway, plasma folate levels and colorectal cancer in a prospective study. Int J Cancer. 2004;110(4):617-20.
123. Morin I et al. Evaluation of genetic variants in the reduced folate carrier and in glutamate carboxypeptidase II for spina bifida risk. Mol Genet Metab. 2003;79(3):197-200.
124. Relton CL et al. Gene-gene interaction in folate-related genes and risk of neural tube defects in a UK population. J Med Genet. 2004;41(4):256-60.
125. Frosst P et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Nat Genet. 1995;10(1):111-13.
126. Vannucchi H, Melo SS. Hiper-homocisteinemia e risco cardio-metabólico. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia. 2009;53(5):540-49.
127. van der Put NM et al. Decreased methylene tetrahydrofolate reductase activity due to the 677C-->T mutation in families with spina bifida offspring. J Mol Med. 1996;74(11):691-94.
128. Engbersen AM et al. Thermolabile 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase as a cause of mild hyperhomocysteinemia. Am J Hum Genet. 1995;56(1):142-50.
129. Pereira A et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) c677t gene variant modulates the homocysteine folate correlation in a mild folate-deficient population. Clinica Chimica Acta. 2004;340(1-2):99-105.
130. Friso S et al. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. Proc Natl Acad Sci USA. 2002;99(8):5606-11.
131. Russo GT et al. Age and gender affect the relation between methylenetetrahydrofolate reductase C677T genotype and fasting plasma homocysteine concentrations in the Framingham Offspring Study Cohort. J Nutr. 2003;133(11):3416-21.
132. Yamada K et al. Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase. Proc Natl Acad Sci USA. 2001;98(26):14853-58.
133. Guenther BD et al. The structure and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from Escherichia coli suggest how folate ameliorates human hyperhomocysteinemia. Nat Struct Biol. 1999;6(4):359-65.
134. Mornet E et al. Screening of the C677T mutation on the methylenetetrahydrofolate reductase gene in French patients with neural tube defects. Hum Genet. 1997;100(5-6):512-14.
135. Scott J, Weir D. Homocysteine and cardiovascular disease. QJM. 1996;89(8):561-63.
136. Cunha A et al. Metabolic effects of C677T and A1298C mutations at the MTHFR gene in Brazilian children with neural tube defects. Clinica Chimica Acta. 2002;318(1-2):139-43.
137. Christensen B et al. Genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase, folate levels in red blood cells, and risk of neural tube defects. Am J Med Genet. 1999;84(2):151-57.
138. Volcik KA et al. Methylenetetrahydrofolate reductase and spina bifida: evaluation of level of defect and maternal genotypic risk in Hispanics. Am J Med Genet. 2000;95(1):21-27.
139. van der Put NM et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? Am J Hum Genet. 1998;62(5):1044-51.
140. Zetterberg H et al. Gene-gene interaction between fetal MTHFR 677C>T and transcobalamin 776C>G polymorphisms in human spontaneous abortion. Hum Reprod. 2003;18(9):1948-50.
141. Gemmati D et al. C677T substitution in the methylenetetrahydrofolate reductase gene as a risk factor for venous throm-

bosis and arterial disease in selected patients. Haematologica. 1999;84(9):824-28.
142. Gohil R, Peck G, Sharma P. The genetics of venous thromboembolism. A meta-analysis involving approximately 120,000 cases and 180,000 controls. Thromb Haemost. 2009;102(2):360-70.
143. Clarke R et al. Homocysteine and coronary heart disease: meta-analysis of MTHFR case-control studies, avoiding publication bias. PLoS Med. 2012;9(2):e1001177.
144. Holmes MV et al. Effect modification by population dietary folate on the association between MTHFR genotype, homocysteine, and stroke risk: a meta-analysis of genetic studies and randomised trials. Lancet. 2011;378(9791):584-94.
145. Xuan C et al. Association between polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and risk of myocardial infarction: a meta-analysis for 8,140 cases and 10,522 controls. Arch Med Res. 2011;42(8):677-85.
146. Ren A, Wang J. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and the risk of unexplained recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. Fertil Steril. 2006;86(6):1716-22.
147. Bagley PJ, Selhub J. A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells. Proc Natl Acad Sci USA. 1998;95(22):13217-20.
148. Molloy AM et al. Whole-blood folate values in subjects with different methylenetetrahydrofolate reductase genotypes: differences between the radioassay and microbiological assays. Clin Chem. 1998;44(1):186-88.
149. Parle-McDermott A et al. MTHFD1 R653Q polymorphism is a maternal genetic risk factor for severe abruptio placentae. Am J Med Genet A. 2005;132(4):365-68.
150. Marco P et al. Evaluation of a methylenetetrahydrofolate-deh--ydrogenase 1958G>A polymorphism for neural tube defect risk. J Hum Genet. 2006;51(2):98-103.
151. Parle-McDermott A et al. Confirmation of the R653Q polymorphism of the trifunctional C1-synthase enzyme as a maternal risk for neural tube defects in the Irish population. Eur J Hum Genet. 2006;14(6):768-72.
152. Furness DL et al. One-carbon metabolism enzyme polymorphisms and uteroplacental insufficiency. Am J Obstet Gynecol. 2008;199(3):276.e1-8.
153. Lievers KJ et al. Polymorphisms in the transcobalamin gene: association with plasma homocysteine in healthy individuals and vascular disease patients. Clin Chem. 2002;48(9):1383-89.
154. Afman LA. Reduced vitamin B12 binding by transcobalamin II increases the risk of neural tube defects. QJM. 2001;94(3):159-66.
155. Miller JW et al. Transcobalamin II 775G>C polymorphism and indices of vitamin B12 status in healthy older adults. Blood. 2002;100(2):718-20.
156. Swanson DA et al. Evaluation of transcobalamin II polymorphisms as neural tube defect risk factors in an Irish population. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2005;73(4):239-44.
157. Li N et al. Polymorphism of human transcobalamin II: substitution of proline and/or glutamine residues by arginine. Biochim Biophys Acta. 1994;1219(2):515-20.
158. Li N et al. Isolation and sequence analysis of variant forms of human transcobalamin II. Biochim Biophys Acta. 1993;1172(1-2):21-30.
159. Namour F et al. Transcobalamin codon 259 polymorphism in HT-29 and Caco-2 cells and in Caucasians: relation to transcobalamin and homocysteine concentration in blood. Blood. 2001;97(4):1092-98.
160. Trentin R. Efeitos dos polimorfismos no gene TC2 nas concentrações dos metabólitos marcadores da deficiência de cobalima em gestantes e seus recém nascidos [dissertação]. Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade de São Paulo. São Paulo; 2006.
161. Barsh GS et al. Guidelines for genome-wide association studies. PLoS Genet. 2012;8(7):e1002812.
162. Tanaka T et al. Genome-wide association study of vitamin B6, vitamin B12, folate, and homocysteine blood concentrations. Am J Hum Genet. 2009;84(4):477-82.
163. Keene KL et al. Genetic associations with plasma B12, B6, and folate levels in an ischemic stroke population from the vitamin intervention for stroke prevention (VISP) trial. Front Public Health. 2014;2:112.
164. Hazra A et al. Genome-wide significant predictors of metabolites in the one-carbon metabolism pathway. Hum Mol Genet. 2009;18(23):4677-87.
165. Carter TC et al. Common variants at putative regulatory sites of the tissue nonspecific alkaline phosphatase gene influence circulating pyridoxal 5'-phosphate concentration in healthy adults. J Nutr. 2015;145(7):1386-93.
166. Weiss MJ et al. A missense mutation in the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene causing a lethal form of hypophosphatasia. Proc Natl Acad Sci USA. 1988;85(20):7666-69.
167. Whyte MP et al. Markedly increased circulating pyridoxal--5'-phosphate levels in hypophosphatasia. Alkaline phosphatase acts in vitamin B6 metabolism. J. Clin. Invest. 1985;76(2):752-56.
168. García-Minguillán CJ, Fernandez-Ballart JD, Ceruelo S, Ríos L, Bueno O, Berrocal-Zaragoza MI, Molloy AM, Ueland PM, Meyer K, Murphy MM. Riboflavin status modifies the effects of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase reductase (MTRR) polymorphisms on homocysteine. Genes Nutr. 2014;9(6):435.
169. Gaughan DJ et al. The methionine synthase reductase (MTRR) A66G polymorphism is a novel genetic determinant of plasma homocysteine concentrations. Atherosclerosis. 2001;157(2):451-56.
170. Leclerc D et al. Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the B12G complementation group of folate/cobalamin disorders. Hum Mol Genet. 1996;5(12):1867-74.
171. Lucock M et al. An examination of polymorphic genes and folate metabolism in mothers affected by a spina bifida pregnancy. Mol Genet Metab. 2001;73(4):322-32.
172. van der Put NM et al. Sequence analysis of the coding region of human methionine synthase: relevance to hyperhomocysteinaemia in neural-tube defects and vascular disease. QJM. 1997;90(8):511-17.
173. Doolin MT et al. Maternal genetic effects, exerted by genes involved in homocysteine remethylation, influence the risk of spina bifida. Am J Hum Genet. 2002;71(5):1222-26.
174. Bosco P et al. Methionine synthase (MTR) 2756 (A --> G) polymorphism, double heterozygosity methionine synthase 2756 AG/methionine synthase reductase (MTRR) 66 AG, and elevated homocysteinemia are three risk factors for having a child with Down syndrome. Am J Med Genet A. 2003;121A(3):219-24.
175. Harmon DL et al. Methionine synthase D919G polymorphism is a significant but modest determinant of circulating homocysteine concentrations. Genet Epidemiol. 1999;17(4):298-309.

176. Wilson A et al. A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida. Mol Genet Metab. 1999;67(4):317-23.
177. Guéant-Rodriguez RM et al. Transcobalamin and methionine synthase reductase mutated polymorphisms aggravate the risk of neural tube defects in humans. Neurosci Lett. 2003;344(3):189-92.
178. Pietrzyk JJ et al. Polymorphisms of the 5,10-methylene-tetrahydrofolate and the methionine synthase reductase genes as independent risk factors for spina bifida. J Appl Genet. 2003;44(1):111-13.
179. Hobbs CA et al. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome. Am J Hum Genet. 2000;67(3):623-30.
180. O'Leary VB et al. MTRR and MTHFR polymorphism: link to Down syndrome? Am J Med Genet. 2002;107(2):151-55.
181. Aléssio AC et al. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase reductase genes and homocysteine levels in Brazilian children. Am J Med Genet A. 2004;128A(3):256-60.
182. Tsai MY et al. High prevalence of a mutation in the cystathionine beta-synthase gene. Am J Hum Genet. 1996;59(6):1262-67.
183. Aléssio AC et al. Polymorphisms in the CBS gene and homocysteine, folate and vitamin B12 levels: association with polymorphisms in the MTHFR and MTRR genes in Brazilian children. Am J Med Genet A. 2008;146A(20):2598-602.
184. Marcucci R et al. Genetic determinants of fasting and post-methionine hyperhomocysteinemia in patients with retinal vein occlusion. Thromb Res. 2003;110(1):7-12.
185. Sebastio G et al. The molecular basis of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency in Italian families, and report of four novel mutations. Am J Hum Genet. 1995;56(6):1324-33.
186. Gaustadnes M et al. Intermediate and severe hyperhomocysteinemia with thrombosis: a study of genetic determinants. Thromb Haemost. 2000;83(4):554-58.
187. Franchis R et al. Contribution of the cystathionine beta-synthase gene (844ins68) polymorphism to the risk of early-onset venous and arterial occlusive disease and of fasting hyperhomocysteinemia. Thromb Haemost. 2000;84(4):576-82.
188. Chango A, Pogribny IP. Considering maternal dietary modulators for epigenetic regulation and programming of the fetal epigenome. Nutrients. 2015;7(4):2748-70.
189. Brookes E, Shi Y. Diverse epigenetic mechanisms of human disease. Annu Rev Genet. 2014;48:237-68.
190. López-Pedrera C et al. Cardiovascular risk in systemic autoimmune diseases: epigenetic mechanisms of immune regulatory functions. Clin Dev Immunol. 2012;2012:974648.
191. Barres R, Zierath JR. DNA methylation in metabolic disorders. Am J Clin Nutr. 2011;93(4):897S-900.
192. Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. Nat Rev Cancer. 2011;11(10):726-34.
193. Hewagama A, Richardson B. The genetics and epigenetics of autoimmune diseases. J Autoimmun. 2009;33(1):3-11.
194. Rodenhiser D, Mann M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. CMAJ. 2006;174(3):341-48.
195. Anderson OS, Sant KE, Dolinoy DC. Nutrition and epigenetics: an interplay of dietary methyl donors, one-carbon metabolism and DNA methylation. J Nutr Biochem. 2012;23(8):853-59.
196. Oommen AM et al. Roles for nutrients in epigenetic events. J Nutr Biochem. 2005;16(2):74-77.
197. Shin W et al. Choline intake exceeding current dietary recommendations preserves markers of cellular methylation in a genetic subgroup of folate-compromised men. J Nutr. 2010;140(5):975-80.
198. Stover PJ. One-carbon metabolism-genome interactions in folate-associated pathologies. J Nutr. 2009;139(12):2402-05.
199. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. Nat Rev Genet. 2002;3(6):415-28.
200. Miller JW et al. Folate-deficiency-induced homocysteinaemia in rats: disruption of S-adenosylmethionine's co-ordinate regulation of homocysteine metabolism. Biochem J. 1994;298(2):415-19.
201. Davis CD, Uthus EO. DNA methylation, cancer susceptibility, and nutrient interactions. Exp Biol Med (Maywood). 2004;229(10):988-95.
202. Yi P et al. Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation. J Biol Chem. 2000;275(38):29318-23.
203. Isakovic L et al. Constrained (l-)-S-adenosyl-l-homocysteine (SAH) analogues as DNA methyltransferase inhibitors. Bioorg Med Chem Lett. 2009;19(10):2742-46.
204. Kim YI. Folate and carcinogenesis: evidence, mechanisms, and implications. J Nutr Biochem. 1999;10(2):66-88.
205. Farias N et al. The effects of folic acid on global DNA methylation and colonosphere formation in colon cancer cell lines. J Nutr Biochem. 2015;26(8):818-26.
206. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. N Engl J Med. 2003;349(21):2042-54.
207. Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. Science. 2001;293(5532):1089-93.
208. Gaudet F et al. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. Science. 2003;300(5618):489-92.
209. Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. Nat Rev Genet. 2013;14(3):204-20.
210. Waterland RA, Jirtle RL. Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. Mol Cell Biol. 2003;23(15):5293-300.
211. Chim SS et al. Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma. Proc Natl Acad Sci USA. 2005;102(41):14753-58.

Zinco 14

Bruna Zavarize Reis
Graziela Biude Silva
Silvia Maria Franciscato Cozzolino

INTRODUÇÃO

O zinco é um mineral essencial para o crescimento, o desenvolvimento e a diferenciação de todos os tipos de organismos, incluindo os microrganismos, as plantas e os animais, sendo um dos elementos traços mais abundantes no corpo humano. Seu conteúdo varia de 1,5 g em mulheres a 2,5 g em homens. É encontrado em vários tecidos, mas sua maior concentração, cerca de 85%, está nos tecidos muscular e ósseo, e apenas 1% na circulação sanguínea.[1-3]

Estima-se que o zinco participe da constituição de mais de 2.700 enzimas, muitas das quais estão envolvidas no metabolismo de carboidratos, proteínas, lipídios e na síntese e degradação de ácidos nucleicos. Em aproximadamente 70% dessas enzimas, o zinco tem função de catalisador, mas também pode ter papel estrutural, agir como substrato ou atuar como regulador da atividade enzimática.[4, 5]

Por meio de suas três funções – catalítica, estrutural e regulatória – o zinco desempenha função relevante nas respostas imune e inflamatória e no estresse oxidativo.[6]

Na resposta inflamatória, o papel estrutural desse elemento nos receptores ativados por proliferador de peroxissomos (PPAR) reduz a ativação do fator nuclear kappa B (NF-kB), e a proteína dedo de zinco A20 parece atuar da mesma forma. O NF-kB é um fator de transcrição altamente conservado durante a evolução e sua translocação para o núcleo celular regula a expressão de centenas de genes, como os de citocinas pró-inflamatórias, de proteínas de fase aguda, de moléculas de adesão, entre outras. Dessa forma, a proteína A20 inibe, indiretamente, a expressão de citocinas com ação pró-inflamatória, como as interleucinas (IL) 1beta, 6, 8 e o fator de necrose tumoral-alfa (TNF-alfa).[7-9]

A função estrutural do zinco também está ligada à sua capacidade de estabilizar membranas celulares, uma vez que a deficiência de zinco está associada ao aumento da fragilidade osmótica dos eritrócitos em humanos.[10] Alguns autores sugerem que o mineral esteja envolvido na formação da dematina, proteína essencial para a manutenção da morfologia celular, motilidade e integridade estrutural da membrana.[11, 12]

O papel antioxidante do zinco refere-se, principalmente, à sua participação na estrutura das enzimas superóxido dismutase 1 e 3 (SOD1 e SOD3) e na manutenção das concentrações de metalotioneínas (MT), visto que o mineral não pode interagir diretamente com um radical livre.[13]

Vários sistemas fisiológicos contribuem para a homeostase corporal do zinco sob diferentes condições, sendo o trato gastrintestinal um dos principais responsáveis por esse mecanismo. O equilíbrio é obtido pela modulação da quantidade de zinco de origem alimentar absorvido e pela quantidade de zinco endógeno excretado.[14] A regulação da excreção urinária ocorre quando há ingestões extremamente altas ou baixas de zinco. Além disso, a redistribuição tecidual e celular do mineral também pode favorecer a homeostase.[15]

Em humanos, o intestino delgado é o sítio primário de absorção do zinco exógeno, a qual é regulada por mecanismos de difusão e processos mediados por carreadores. O transporte ativo é saturável em altas concentrações do metal no lúmen do intestino e tem sua eficiência aumentada durante períodos de baixa ingestão. Em situações de alto consumo, a absorção ocorre por mecanismo de difusão passiva sem saturação. Parte do zinco presente no lúmen intestinal é oriunda das secreções pancreáticas, biliares e intestinais, bem como da descamação das células da mucosa.[16]

Após ser absorvido, o zinco é liberado pelos transportadores da membrana basolateral dos enterócitos, passa para os capilares mesentéricos e é direcionado para

a circulação portal, sendo captado pelo fígado e distribuído para os outros tecidos. Seu transporte no sangue é mediado pela albumina e, em menor quantidade, pela macroglobulina, transferrina, cisteína e histidina.[17, 18]

A homeostase do zinco é mantida por meio de mecanismos que incluem a regulação da expressão de genes, como aqueles que codificam proteínas transportadoras de zinco e MT.[19] No entanto, quando a ingestão alimentar de zinco é muito baixa, os mecanismos homeostáticos podem ser insuficientes para repor as perdas, resultando em equilíbrio negativo do mineral.[20]

A adequação da ingestão de zinco é afetada pela presença de fatores antinutricionais que inibem sua absorção, sendo o fitato o principal deles. Dietas baseadas em cereais integrais ou tubérculos e com quantidades insignificantes de alimentos de origem animal aumentam as necessidades nutricionais do mineral e, portanto, aumentam o risco de deficiência.

O desenvolvimento da deficiência de zinco pode ser atribuído ao menos a cinco causas gerais que ocorrem de forma isolada ou combinadas, as quais incluem ingestão inadequada, aumento das necessidades, má absorção, perdas aumentadas e utilização prejudicada.[21] A ingestão inadequada de zinco geralmente é a principal causa de deficiência na maioria das situações.[22, 23]

Estima-se que cerca de 10% do proteoma humano consista em proteínas potencialmente ligadas ao zinco.[4] Esse número explica a importância do mineral na síntese de DNA, RNA e diversas proteínas, assim como na preservação da estabilidade do genoma, em razão de sua participação na regulação e/ou estrutura de proteínas envolvidas no reparo do DNA.[24]

ZINCO E NUTRIGENÔMICA

Aspectos básicos

Como abordado em capítulos anteriores, as interações entre os nutrientes e os genes podem ocorrer de várias formas. Uma delas é a interação direta, na qual o nutriente liga-se a um fator de transcrição, ativando-o e induzindo-o à expressão de genes.[25] Nesse sentido, um dos fatores de transcrição mais estudados em relação à homeostase do zinco é o fator de transcrição regulador de metal 1 (MTF-1, *metal-regulatory transcription factor 1*).[26] Ele funciona como um sensor intracelular de zinco, ligando-se direta e reversivelmente ao mineral e, posteriormente, transferindo-se para o núcleo da célula, onde se liga aos elementos de resposta a metais (MRE, *metal response element*) em regiões regulatórias de genes específicos, promovendo o aumento ou a diminuição da transcrição destes.[27] Há descrições também a respeito do fator de transcrição *Krüppel-like factor 4* (KLF4), que tem sua expressão induzida durante a restrição alimentar de zinco, e que também foi identificado como regulador da transcrição de genes relacionados à homeostase do zinco, como o *SLC39A4,* que codifica a proteína transportadora ZIP4 (*Zrt- and Irt-like protein 4*).[28]

Proteínas transportadoras de zinco

Dentre os genes que têm sua expressão modificada pela ingestão de zinco alimentar, podem-se citar os que codificam transportadores de zinco, constituídos por duas grandes famílias, a ZIP e a ZnT (transportadores de zinco), pertencentes à mesma classe, SLC (*solute-linked carrier* ou transportador ligado ao soluto), porém com atividades opostas na homeostase celular do mineral.[5, 29]

A família ZnT ou SLC30 atua transportando o zinco do citoplasma para fora das células ou para dentro de vesículas intracelulares, ou seja, retira zinco do citoplasma. De forma contrária, a família ZIP ou SLC39 transporta o zinco do meio extracelular e de vesículas para o citoplasma.[30, 31] A grande variedade de transportadores apresenta diferentes padrões de expressão gênica frente à variação na ingestão de zinco. A Figura 14.1 ilustra a ação desses transportadores na célula, indicando a direção do transporte de íons Zn^{2+} nas membranas celulares.

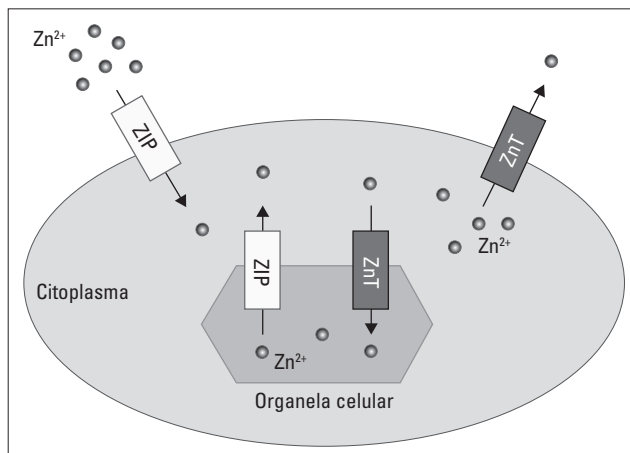



Figura 14.1 Transporte celular de zinco para o citoplasma e para as organelas mediado por duas famílias de transportadores: ZnT (SLC30) e ZIP (SLC39). **Fonte:** adaptada de Kambe et al.[32]

Família ZnT (SLC30A)

Esta família de transportadores é constituída por aproximadamente dez proteínas que atuam na redução da concentração citoplasmática de zinco. Os genes que codificam tais transportadores, em seres humanos, são denominados *SLC30A1* a *SLC30A10* e produzem as proteínas ZnT1 a ZnT10, respectivamente (Tabela 14.1). Em roe-

dores, esses genes são denominados *Slc30a1* a *Slc30a10*. A maioria desses transportadores possui seis domínios transmembrana e está localizada nos compartimentos intracelulares, geralmente associados a endossomos, complexo de Golgi e retículo endoplasmático.[33]

O primeiro transportador de zinco a ser descoberto foi o ZnT1, em virtude da sua capacidade de conferir resistência a concentrações extracelulares elevadas de zinco. Em humanos e roedores, essa proteína encontra-se amplamente distribuída pelos tecidos e é mais expressa naqueles envolvidos com a absorção, como o intestino delgado, sendo abundante ao longo da membrana basolateral dos enterócitos, onde pode participar da transferência de zinco para a circulação sanguínea.[34, 35]

A expressão elevada de ZnT1 em células de humanos e roedores aumenta o efluxo de zinco e reduz a sua concentração intracelular, enquanto a diminuição da sua expressão resulta em maior retenção de zinco no citoplasma das células, evidenciando que a expressão desse transportador é crucial para a manutenção da homeostase do zinco e, em particular, para melhorar a sua retenção em células submetidas à privação do mineral.[34, 36, 37]

A expressão gênica do ZnT1 é rapidamente induzida em cultura de células de camundongos após tratamento com zinco, sendo regulada pelo MTF-1.[38, 39] Por outro lado, a deficiência de zinco no meio de cultura pode reduzir a sua expressão, evidenciando que essa proteína também pode ser influenciada diferencialmente pela ingestão de zinco.[38]

Os transportadores ZnT2 a ZnT4 e ZnT8 estão localizados predominantemente em tecidos humanos envolvidos com atividade secretora, como glândulas mamárias, neurônios glutamatérgicos, próstata e células beta pancreáticas.[40-44] O ZnT2 pode ser encontrado também na membrana apical de enterócitos no intestino delgado de roedores, tendo sua expressão aumentada em resposta ao consumo alimentar aumentado de zinco.[45]

O transportador ZnT3, detectado primeiramente no cérebro e em células beta pancreáticas de ratos, parece não ter sua expressão influenciada pelo zinco alimentar.[46] Entretanto, a expressão gênica e proteica do *Slc30a3* nas células beta pancreáticas é aumentada de forma dose-dependente pela concentração de glicose.[47]

A presença do ZnT4 nas glândulas mamárias de ratos tem papel importante durante a amamentação. Uma mutação nesse gene ocasiona produção de leite deficiente em zinco, descrito como leite letal (*lethal milk*). Os filhotes amamentados por ratas com tal mutação são incapazes de sobreviver se não receberem suplementação de zinco.[43] Entretanto, não existem relatos da presença dessa mutação em humanos. A expressão desse transportador parece não ser dependente do estado nutricional em relação ao zinco. No entanto, durante a lactação, uma redução da ingestão de zinco parece aumentar a sua expressão nas glândulas mamárias de ratas,

Tabela 14.1 Transportadores de zinco da família SLC30A: localização e regulação da expressão em resposta ao zinco alimentar

Transportador	Gene	Localização tecidual	Localização celular	Resposta ao zinco alimentar
ZnT1	*SLC30A1*	Ubíqua	Membrana plasmática	ZnD (–) ZnE (+)
ZnT2	*SLC30A2*	Glândulas mamárias, próstata, retina, pâncreas, intestino delgado, rins	Membrana plasmática, mitocôndrias, vesículas intracelulares	ZnD (–) ZnE (+)
ZnT3	*SLC30A3*	Cérebro, testículos, pâncreas	Vesícula sináptica	*
ZnT4	*SLC30A4*	Ubíqua, predominante em glândulas mamárias, placenta, próstata, cérebro e rins	Membrana plasmática, vesículas intracelulares	ZnD (+)
ZnT5	*SLC30A5*	Ubíqua, predominante no coração, placenta, pâncreas, próstata, ovários, testículos, intestino delgado, timo e ossos	Membrana plasmática, vesículas intracelulares, complexo de Golgi	ZnE (–)
ZnT6	*SLC30A6*	Ubíqua, predominante no cérebro, pulmões e intestino	Vesículas intracelulares, complexo de Golgi	*
ZnT7	*SLC30A7*	Ubíqua, predominante no intestino, estômago, próstata, retina, pâncreas, testículos e músculos	Vesículas intracelulares, complexo de Golgi	ZnD (–) ZnE (+)
ZnT8	*SLC30A8*	Pâncreas, tireoide, glândula adrenal, testículos	Grânulos secretórios	ZnD (–)
ZnT9	*SLC30A9*	Ubíqua	Citoplasma, núcleo	*
ZnT10	*SLC30A10*	Cérebro, retina, fígado	Desconhecida	*

ZnD: dieta deficiente em zinco; ZnE: dieta com excesso de zinco; (+): aumento da expressão; (–): redução da expressão; *: nenhum estudo observou efeito do zinco alimentar na expressão deste gene ou proteína. **Fonte:** esta tabela é uma adaptação do modelo disponível em http://www.bioparadigms.org. As referências utilizadas estão descritas ao longo do texto.

tendo papel relevante na transferência desse mineral para o leite.[42]

O ZnT5 é amplamente distribuído nos tecidos, e verificou-se que, em seres humanos, altas doses de zinco alimentar reduzem sua expressão no intestino delgado.[48]

O ZnT6, embora seja detectado em diversos tecidos humanos, é predominantemente expresso no cérebro, nos pulmões e no intestino. Intracelularmente, ele está localizado no complexo de Golgi e nas vesículas celulares, porém essa distribuição é regulada pela concentração de zinco. Esse transportador se desloca para a periferia das células em resposta ao aumento de zinco extracelular, embora sua expressão se mantenha inalterada.[49]

O ZnT7 está presente predominantemente no intestino delgado, no estômago, na próstata, na retina, no pâncreas, nos testículos e nos músculos de humanos e roedores. Em células mononucleares de humanos, a sua expressão responde de forma positiva à suplementação de zinco e diminui durante a deficiência desse mineral.[50]

O transportador ZnT8 é predominantemente expresso em células beta pancreáticas de humanos e roedores, onde realiza o influxo de zinco aos grânulos secretórios para a maturação e cristalização da insulina antes de sua secreção.[40] Dessa forma, defeitos no ZnT8 podem afetar o transporte de zinco para os grânulos secretórios, tendo impacto negativo sobre a primeira fase de liberação de insulina em resposta à concentração de glicose.[51] Smidt et al.[47] observaram que a expressão desse transportador diminui durante a deficiência de zinco em roedores, reduzindo também a expressão de insulina pelas células beta pancreáticas.

Os transportadores ZnT9 e ZnT10 foram pouco estudados até o momento. Sabe-se que o SLC30A9 é amplamente expresso pelos tecidos e o SLC30A10 tem sua expressão restrita ao cérebro e fígado de fetos humanos.[33] Ambos não parecem ter sua expressão afetada por variações na concentração de zinco.[52,53]

Família ZIP (SLC39A)

Esta família de transportadores é formada por 14 proteínas que atuam no aumento das concentrações celulares de zinco. Em seres humanos, os seus genes são denominados *SLC39A1* a *SLC39A14* e codificam as proteínas ZIP1 a ZIP14, respectivamente (Tabela 14.2). Em roedores, esses genes são denominados *Slc39a1* a *Slc39a14*.

A maioria desses transportadores possui oito domínios transmembrana e está localizada em diversos compartimentos intracelulares humanos, incluindo a membrana plasmática, as vesículas intracelulares, os lisossomos, o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático.[54]

O transportador ZIP1 encontra-se amplamente distribuído pelos tecidos humanos. Sua localização celular depende do tipo de célula e da concentração de zinco. Em situações de concentração elevada do mineral, o ZIP1 está presente, principalmente, em organelas intracelulares, deslocando-se para a superfície da célula à medida que a concentração de zinco diminui.[55,56] Sua expressão também parece ser influenciada pela concentração de zinco, apresentando ligeiro aumento durante a deficiência e diminuindo durante a suplementação com o mineral.[50]

A expressão do ZIP2 tem comportamento similar ao ZIP1 em função da concentração de zinco, aumentando de forma significativa durante a depleção do mineral, o que demonstra que essa é a proteína mais responsiva à deficiência de zinco.[50] Entretanto, em humanos, a sua presença parece estar restrita ao útero e à próstata.[57]

O transportador ZIP3 também apresenta distribuição ubíqua nos tecidos, sendo predominante nas glândulas mamárias e nos testículos de humanos. Em cultura de células mononucleares humanas, a sua expressão diminui durante a depleção de zinco.[50]

A expressão do ZIP4 é maior em tecidos humanos envolvidos com a absorção/reabsorção de zinco, sendo, desse modo, o intestino delgado e os rins os locais de maior abundância da proteína.[58] Sua expressão em humanos e em roedores parece ser regulada por mecanismos transcricionais e pós-transcricionais em resposta à ingestão de zinco, aumentando durante a deficiência e diminuindo após a suplementação desse mineral.[48,59] Além disso, a sua localização celular também varia em resposta à restrição nutricional de zinco em camundongos, situando-se nas membranas apicais dos enterócitos durante a deficiência e sendo internalizado e degradado após a repleção do mineral.[60] Isso sugere que a regulação da expressão e localização celular do ZIP4 em órgãos essenciais à aquisição de zinco alimentar, como o intestino delgado, desempenha papel fundamental na homeostase do mineral.[34] O fator de transcrição KLF4, que é induzido durante a restrição de zinco, foi identificado como um dos responsáveis pelo aumento da transcrição do *Slc39a4* em camundongos.[28]

O transportador ZIP5 apresenta distribuição tecidual semelhante ao ZIP4, sendo expresso ao longo do trato gastrintestinal de humanos e animais. Entretanto, em animais, a sua localização celular é oposta ao ZIP4, inclusive em resposta à ingestão alimentar de zinco. Quando há ingestão adequada do mineral, o ZIP5 situa-se na membrana basolateral dos enterócitos de camundongos, sendo internalizado e degradado durante a deficiência nutricional de zinco.[61] Apesar disso, a expressão gênica desse transportador parece não variar em resposta ao zinco alimentar, assim como o ZIP6. Este último possui dis-

Tabela 14.2 Transportadores de zinco da família *SLC39A*: localização e regulação da expressão em resposta ao zinco alimentar

Transportador	Gene	Localização tecidual	Localização celular	Resposta ao zinco alimentar
ZIP1	*SLC39A1*	Ubíqua	Membrana plasmática, vesículas celulares	ZnD (+) ZnE (–)
ZIP2	*SLC39A2*	Útero e próstata	Membrana plasmática	ZnD (+) ZnE (–)
ZIP3	*SLC39A3*	Ubíqua, principalmente em glândulas mamárias e testículos	Membrana plasmática, lisossomos	ZnD (–)
ZIP4	*SLC39A4*	Trato gastrintestinal, rins, neurônios do hipocampo	Membrana plasmática, superfície apical dos enterócitos, lisossomos	ZnD (+)
ZIP5	*SLC39A5*	Trato gastrintestinal, pâncreas, rins, fígado	Membrana plasmática, superfície basolateral dos enterócitos	*
ZIP6	*SLC39A6*	Ubíqua	Membrana plasmática	*
ZIP7	*SLC39A7*	Ubíqua	Retículo endoplasmático, vesículas celulares, complexo de Golgi	ZnE (–)
ZIP8	*SLC39A8*	Ubíqua, principalmente em linfócitos T, eritrócitos e testículos	Membrana plasmática, lisossomos, mitocôndrias	*
ZIP9	*SLC39A9*	Desconhecida	Complexo de Golgi	*
ZIP10	*SLC39A10*	Cérebro, fígado, eritrócitos, rins	Membrana plasmática	ZnD (+) ZnE (–)
ZIP11	*SLC39A11*	Estômago, ceco, cólon, testículos	Membrana plasmática, complexo de Golgi e núcleo	ZnD (–) ZnE (+)
ZIP12	*SLC39A12*	Cérebro, pulmões, testículos, retina	Membrana plasmática	ZnD (+)
ZIP13	*SLC39A13*	Ubíqua	Vesículas celulares, complexo de Golgi	*
ZIP14	*SLC39A14*	Ubíqua, principalmente no fígado e intestino delgado	Membrana plasmática	*

ZnD: dieta deficiente em zinco; ZnE: dieta com excesso de zinco; (+): aumento da expressão; (–): redução da expressão; *: nenhum estudo observou efeito do zinco na expressão deste gene ou proteína. **Fonte:** esta tabela é uma adaptação do modelo disponível em http://www.bioparadigms.org. As referências utilizadas estão descritas ao longo do texto.

tribuição ubíqua nos tecidos humanos; entretanto, parece ser mais expresso naqueles sensíveis a hormônios esteroides, como a placenta, as glândulas mamárias e os testículos, atuando como importador celular de zinco.[62]

O ZIP7 também possui distribuição ubíqua nos tecidos humanos, com papel crucial na redução da concentração de zinco no retículo endoplasmático, nas vesículas celulares e no complexo de Golgi, organelas nas quais esse transportador é encontrado. Essa proteína parece ter sua expressão inibida sob altas concentrações de zinco, não afetando, contudo, a sua localização celular.[63]

O ZIP8 é expresso em linfócitos T e localiza-se predominantemente nos lisossomos de humanos. Desempenha papel crucial no início do processo inflamatório, contribuindo para a citoproteção. A inibição da expressão desse transportador reduz as concentrações de zinco celular, comprometendo a função mitocondrial em resposta ao TNF-alfa, além de aumentar a morte celular.[64] Em camundongos, a sua expressão parece não depender da concentração de zinco, entretanto, a sua localização celular pode variar em resposta a ela. Durante a deficiência, o ZIP8 pode estar situado na membrana plasmática e ser internalizado após a repleção do mineral.[65]

O transportador ZIP9 foi pouco estudado. Não se conhece exatamente a sua localização tecidual em humanos, porém sabe-se que, intracelularmente, ele está presente no complexo de Golgi, independentemente do estado nutricional em relação ao zinco.[66]

O *Slc30a10*, que codifica o ZIP10, foi o primeiro gene da família ZIP identificado como alvo do MTF-1 em camundongos. Entretanto, a sua expressão é suprimida por esse fator de transcrição, ao contrário do observado com alguns transportadores da família ZnT, cuja expressão é ativada por ele.[67] Em células animais, a expressão do gene e o consequente aumento da proteína ocorrem durante a deficiência de zinco, inibida após a repleção do mineral.[68] Em humanos, a sua localização tecidual ainda não foi descrita; porém, com relação à sua localização celular, sugere-se que esteja presente na membrana plasmática.[54]

O transportador ZIP11 foi recentemente descoberto no trato gastrintestinal e em testículos de camundongos. A sua localização celular parece variar entre

membrana plasmática, complexo de Golgi e/ou núcleo, dependendo do tecido onde é encontrado. A sua expressão é regulada pela ingestão alimentar de zinco, diminuindo durante a deficiência e aumentando após a suplementação.[69-71]

O ZIP12, codificado pelo gene *SLC39A12*, foi descoberto por meio de análises de expressão de genes em diferentes tecidos humanos. Esse transportador é altamente expresso no cérebro, sendo essencial para a diferenciação neuronal.[71] A deficiência de zinco, além de provocar aumento na expressão gênica desse transportador, promove a sua redistribuição do espaço perinuclear para o citoplasma e membrana plasmática.[72,73]

A proteína transportadora de zinco ZIP13 desempenha papel crítico no desenvolvimento ósseo, dental e de todo o tecido conjuntivo humano. A sua disfunção é responsável pela forma VI da síndrome de Ehlers-Danlos, uma doença hereditária caracterizada por hipermobilidade articular, elasticidade da pele e fragilidade dos tecidos conectivos.[74,75] Essa proteína é altamente expressa no tecido ósseo e em células essenciais para o desenvolvimento do tecido conectivo humano, localizando-se principalmente na região perinuclear e no complexo de Golgi de osteoblastos, condrócitos e fibroblastos.[74]

O ZIP14 localiza-se principalmente na membrana plasmática de hepatócitos de seres humanos e tem papel importante na resposta inflamatória de fase aguda induzida pela IL-6. Ele é responsável por elevar a concentração hepática de zinco durante a endotoxemia, induzindo à hipozincemia transitória característica da inflamação aguda.[76,77]

O duodeno e o jejuno de camundongos expressam mais *Slc39a14* que o fígado, evidenciando o papel importante desse transportador na absorção de zinco alimentar.[76] Sua distribuição e regulação por estímulos pró-inflamatórios sugerem que esse transportador tem papel crucial tanto na resposta inflamatória quanto na manutenção da função de barreira para o trato gastrintestinal.[77]

Metalotioneínas

As MT compreendem um grupo de proteínas intracelulares que podem se ligar tanto a metais essenciais quanto a metais tóxicos. Elas são caracterizadas por seu baixo peso molecular, elevado teor de cisteína, ausência de resíduos de aminoácidos aromáticos e presença de 7 a 12 átomos de metais por molécula. Em razão de seu conteúdo rico em tiol, elas se ligam a diversos elementos traços, incluindo zinco, cádmio, mercúrio, platina e prata, e também protegem as células e os tecidos contra a toxicidade dos metais pesados.[78,79]

Duas isoformas principais de MT, denominadas MT-1 e MT-2, foram identificadas em mamíferos e são encontradas em todos os tipos de tecidos. Outras duas isoformas, denominadas MT-3 e MT-4, também são encontradas em mamíferos, porém em menor quantidade e localização restrita. Em humanos, os genes *MT* estão localizados na região cromossômica 16q13 em *cluster* e podem incluir, pelo menos, 10 genes funcionais já identificados. MT-2, MT-3 e MT-4 são codificadas por um único gene, enquanto a MT-1 inclui muitas isoformas codificadas por um único *locus* funcional, *MT*. As isoformas funcionais conhecidas da MT-1 são: MT-1A, MT-1B, MT-1E, MT-1F, MT-1G, MT-1H e MT-1X. Já a MT-2 possui apenas uma isoforma funcional conhecida, a MT-2A.[80]

Diferentes tipos celulares expressam isoformas e apresentam concentrações variadas de MT, provavelmente em razão das diferentes funções de cada uma. A expressão das proteínas MT-1A e MT-2A é detectada em todos os tipos de células humanas, enquanto as outras, como MT-1B e MT-1E, são expressas de forma específica em função do tipo celular.[81,82]

O fator de transcrição MTF-1 desempenha papel importante no controle da transcrição de MT. Após sua ligação ao zinco intracelular, o MTF-1 é ativado e induzido a entrar no núcleo, onde se liga aos MRE para induzir a expressão de MT (Figura 14.2). A expressão dos genes e, consequentemente, das proteínas, sofre ação direta da disponibilidade de zinco. Quando há excesso do mineral, a expressão de MT aumenta e, em contrapartida, diminui durante a deficiência. Além disso, a própria MT regula a sua expressão, seguindo um circuito de *feedback* negativo. Quando a concentração dessa proteína encontra-se elevada, a sua expressão é diminuída.[83-85]

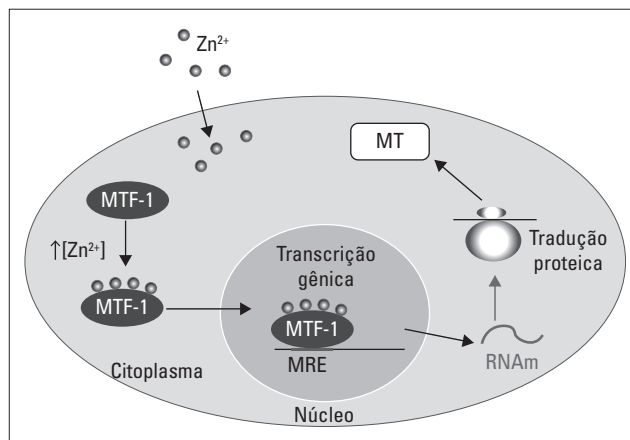



Figura 14.2 Mecanismo de indução da expressão de metalotioneínas (MT) pelo aumento da concentração celular de zinco (Zn^{2+}). O zinco se liga ao fator de transcrição regulador de metal 1 (MTF-1) e transfere-se para o núcleo da célula, onde se liga ao elemento de resposta a metais (MRE) do gene da MT, promovendo o aumento da sua transcrição. O RNA mensageiro (RNAm) transcrito vai para o citoplasma para ser traduzido, o que propicia a tradução da MT correspondente.

Segundo Hambidge,[86] a concentração de MT pode ser utilizada como biomarcador na avaliação do estado nutricional relativo ao zinco, tendo em vista que suas concentrações séricas são significativamente alteradas em resposta à disponibilidade do mineral.

Além da concentração de zinco, as MT podem ter sua expressão ativada por diversos estímulos, incluindo metais pesados, citocinas inflamatórias (IL-6, IL-1 e TNF-alfa) e fatores de crescimento. Durante o estresse oxidativo, a síntese de MT encontra-se substancialmente aumentada, visando proteger as células contra a citotoxicidade e danos no DNA.[87,88]

Dentre as funções das MT, a principal parece ser a de destoxificação de metais pesados, em razão, principalmente, da sua afinidade elevada por estes. Entretanto, outros papéis biológicos têm sido amplamente estudados, como o armazenamento de metais essenciais, o sequestro de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN), o transporte intracelular de zinco, a proteção celular contra a apoptose, entre outros.[89-91]

As MT inibem reações de propagação de radicais livres por meio da ligação seletiva a íons de metais pró-oxidantes, como ferro e cobre, e dos potencialmente tóxicos, como cádmio e mercúrio.[79] Sob condições de estresse oxidativo elevado, ocorre a liberação do zinco ligado à MT, resultando em maior disponibilidade de grupamentos sulfidrilas reduzidos, prontos para atuar na proteção antioxidante. Por sua vez, o zinco liberado é redistribuído na célula e pode ser utilizado em outros mecanismos de proteção antioxidante.[92]

Superóxido dismutase

As ERO, em baixas concentrações, são importantes para a sinalização de eventos celulares e também essenciais para a própria função celular. Sob condições fisiológicas, existe um equilíbrio entre as concentrações de ERO produzidas durante o metabolismo celular normal e as concentrações de antioxidantes endógenos, os quais atuam na proteção tecidual contra danos oxidativos. O desequilíbrio desse balanço, seja por meio do aumento da produção de ERO ou da diminuição das concentrações de antioxidantes, resulta em uma condição denominada estresse oxidativo. Esse processo pode contribuir para o desenvolvimento de doenças como câncer, diabete tipo 2 e doenças cardiovasculares.[93,94]

A superóxido dismutase (SOD) é considerada a primeira e mais importante linha de defesa do sistema antioxidante enzimático e é responsável por dismutar os ânions superóxido ($\bullet O_2^-$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual, por sua vez, é transformado em duas moléculas de água (H_2O) pelas enzimas catalase, glutationas peroxidase e tiorredoxinas. Em mamíferos, três isoformas dessa enzima foram identificadas: a SOD1 (CuZn-SOD) ou citosólica, a SOD2 (Mn-SOD) ou mitocondrial e a SOD3 (EC-SOD) ou extracelular. Embora catalisem a mesma reação, as diferentes localizações dessas isoformas são importantes para sinalização redox compartimentada.[94,95] A SOD1 e a SOD3, isoformas que dependem do zinco para exercerem sua função, serão abordadas a seguir.

Em humanos, o gene que codifica a SOD1 está localizado na região cromossômica 21q22.11 e possui cinco éxons e quatro íntrons. A região promotora proximal do gene da SOD1 contém uma região regulatória rica em CG, bem como TATA box e CCAAT box, que são importantes regiões regulatórias da expressão basal dessa proteína. Além disso, alguns sítios de ligação para AP-1 (*activator protein 1*), NF-kB, Sp1 (*specificity protein 1*) e NF1 (*nuclear factor 1*) foram identificados nessa região, sugerindo que tais fatores de transcrição estão envolvidos na regulação da expressão da SOD1. Essa isoforma localiza-se no citoplasma, no núcleo e no espaço intramembranas das mitocôndrias e sua atividade enzimática depende da presença de zinco e cobre. O zinco participa do dobramento adequado e da estabilidade da proteína.[95-100]

A transcrição do gene da SOD1 pode ser induzida tanto por condições fisiológicas, ou seja, em resposta a mensageiros biológicos, químicos ou mecânicos, quanto por estímulos via ativação de outros elementos regulatórios *cis*. Com relação às condições fisiológicas, o aumento de RNAm pode ocorrer mediante a presença de H_2O_2, óxido nítrico, metais pesados, ácido araquidônico, xenobióticos, irradiação X, entre outros. O aumento da produção de ERO nas células pode levar ao aumento da síntese de SOD1, por meio da ativação de fatores de transcrição e posterior ligação a MRE localizados próximos à região 5', com a finalidade de evitar danos oxidativos. Em relação aos elementos regulatórios, grande parte da expressão de SOD1 é induzida por meio da ligação do NF-kB, do NRf2, do receptor hidrocarbono aril/translocador do receptor nuclear de hidrocarbono aril (AHR/ARNT) ou de proteínas ligadoras do intensificador CAATT (C/EBP, *CCAAT-enhancer-binding proteins*). Por exemplo, a ligação do NF-kB na região promotora da SOD1 em humanos aumenta após a exposição a citocinas e ao estresse oxidativo. O NRf2, por sua vez, mediante condição de estresse celular, é translocado para o núcleo e se liga ao elemento de resposta a antioxidantes (ERA) presente na região promotora de diversos genes, incluindo o *SOD1*, com o objetivo de aumentar a expressão gênica de enzimas antioxidantes. Do mesmo modo, a ativação transcricional do *SOD1* pode ocorrer por meio

do aumento da ligação AHR/ARNT e C/EBP no promotor proximal.[94,96]

A SOD3 (ou EC-SOD – SOD extracelular) foi descoberta em 1982 pelo pesquisador Marklund e seus colaboradores. Essa isoforma é uma glicoproteína levemente hidrofóbica e estável, presente em vários organismos como um tetrâmero, encontrada principalmente nos compartimentos extracelulares, como plasma, linfa, fluido cerebroespinal e líquido articular. Além disso, possui alta afinidade com a heparina e outros proteoglicanos na matriz extracelular e na membrana plasmática.[101-104]

A EC-SOD é a principal enzima responsável por reduzir os danos oxidativos causados por radicais livres no meio extracelular. Essa isoforma está localizada principalmente nos vasos sanguíneos, mais especificamente entre o endotélio e o músculo liso vascular. Sua expressão em células vasculares pode sofrer alterações em resposta a estímulos de citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento e estímulos vasoativos que incluem angiotensina II, óxido nítrico e homocisteína.[105]

Em humanos, o gene da SOD3 está localizado na região cromossômica 4p15.2, com três éxons e dois íntrons, e compartilha 40 a 60% de similaridade com o gene da SOD1. A região promotora contém vários elementos regulatórios, incluindo dois ERA, sítios de ligação AP-1, elementos de resposta a xenobióticos e elementos de resposta ao NF-kB.[106,107]

A expressão do gene *SOD3* e de sua proteína tem especificidade celular e tecidual, ocorrendo principalmente em órgãos como coração, pulmões, vasos sanguíneos, placenta e rins. Com relação às células, grandes quantidades de proteína e de RNAm da SOD3 são encontradas em células alveolares do tipo II, tubulares renais proximais, musculares lisas vasculares, gliais, endoteliais, macrófagos pulmonares e algumas linhagens de fibroblastos.[106]

Estudos *in vitro* em fibroblastos de pele indicam que a expressão tanto do RNAm como da proteína EC-SOD pode ser induzida pela heparina e pelo sulfato de heparano. Os mecanismos responsáveis pela regulação dessa expressão ainda são desconhecidos; entretanto, sugere-se que haja o envolvimento de um receptor nuclear ou um efeito direto em elementos promotores.[108] A regulação da expressão da EC-SOD pode ocorrer por meio de uma variedade de estímulos, como citocinas inflamatórias, fatores de crescimento, hormônios, agentes oxidantes e a ingestão alimentar de zinco.[93,106]

Proteínas dedos de zinco (*zinc finger*)

As estruturas "dedos de zinco" em proteínas foram descritas pela primeira vez em 1985. A definição para esse tipo de proteína pode ser aplicada para qualquer estrutura compacta que é estabilizada por íons de zinco.[109] As "dedos de zinco" apresentam em sua estrutura um circuito alongado formado por aproximadamente 30 aminoácidos, que se mantêm unidos na base por um íon de zinco, o qual é coordenado por quatro resíduos de cisteína e/ou histidina (Figura 14.3), que são responsáveis pela estabilização da pequena estrutura da proteína.[110] Essas pequenas proteínas estão envolvidas em vários processos biológicos, como apoptose, proliferação celular, transcrição, vias de metabolismo e sinalização.[111]

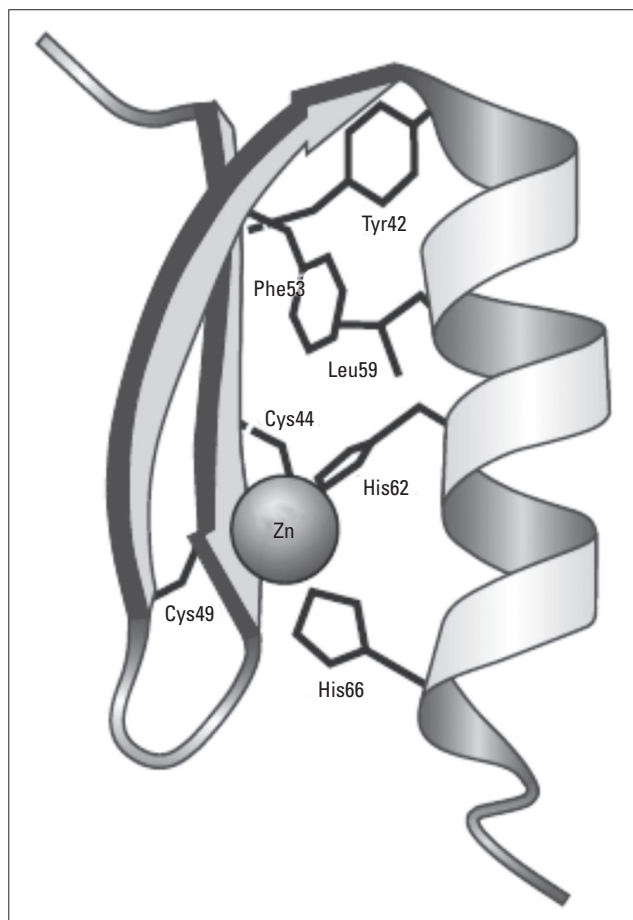



Figura 14.3 Estrutura de uma proteína "dedo de zinco". **Fonte:** adaptada de Nakaseko et al.[112]

Um dos inibidores da ativação do NF-kB é a proteína A20, um fator de transativação que contém sete domínios "dedos de zinco" e é capaz de inibir a expressão gênica de TNF-alfa, de IL-1beta e de outras proteínas com ação pró-inflamatória.[113-115] A indução da expressão da A20 ocorre por meio de sinais dependentes do NF-kB, os quais atuam na restrição da duração e da intensidade da sinalização por meio de várias moléculas envolvidas na via do NF-kB. A regulação desse mecanismo ocorre tanto em nível transcricional como pós-transcricional.[116]

Um estudo *in vitro* realizado por Prasad et al.[117] mostrou que o zinco aumentou a expressão de RNAm da A20, bem como da própria proteína. Essa proteína, em conjunto com o fator associado ao receptor de necrose tumoral 1 (TRAF1, *TNF receptor associated factor 1*), reduz a ativação da via de sinalização IKK/NF-kB e, consequentemente, os marcadores de estresse oxidativo e as citocinas inflamatórias nessas células.

Outra "dedo de zinco" importante é a proteína Sp1, que atua como fator de transcrição ligando-se diretamente ao DNA por meio de três domínios "dedo de zinco" consecutivos na extremidade carboxi terminal. A Sp1 é altamente expressa em tecidos e se liga a sequências de nucleotídeos GC nas regiões promotoras de genes. Um local com sequência de nucleotídeos rico em GC é encontrado na região promotora dos genes das três isoformas da SOD, sugerindo função regulatória comum da Sp1 na expressão dessas enzimas.[97,118, 119]

No caso da SOD1, a superexpressão ectópica de Sp1 aumenta significativamente a atividade basal do promotor do gene dessa enzima. Além disso, a Sp1 pode ativar diretamente a expressão da SOD1 por meio da ligação ao DNA e pode também interagir com outras proteínas envolvidas no aumento da expressão da SOD1.[120, 121] A Sp1, ao se ligar na região promotora proximal do gene da SOD3 em humanos, é importante para a transcrição basal e dependente de tricostatina A, um composto com atividade de inibidor de desacetilase de histonas. Caso haja deleção do sítio de ligação da Sp1, esse mecanismo é anulado.[122]

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O zinco é um elemento traço essencial e desempenha papéis fundamentais no metabolismo celular e na estabilidade do genoma. Atua principalmente por meio de ligações a diversas proteínas, afetando numerosos processos biológicos, que incluem desde a divisão celular até o crescimento e a diferenciação. Desempenha papel crítico na regulação de mecanismos de reparação do DNA, na proliferação celular, na diferenciação e apoptose, envolvendo a ação de vários fatores de transcrição e de DNA ou RNA polimerases. Dessa forma, a deficiência desse micronutriente pode levar a importantes mutações e aberrações cromossômicas, aumentando o risco de doenças crônicas não transmissíveis, como câncer.

Entretanto, os estudos que avaliam a influência da ingestão de zinco na modulação da expressão de genes relacionados tanto ao seu metabolismo quanto ao de proteínas dependentes ainda são escassos. Pouco se sabe acerca da sua função molecular em humanos, sendo essa uma área promissora para a realização de novos estudos de genômica nutricional visando à melhor compreensão do seu papel na promoção da saúde.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. King JC. Zinc. In: Shils ME, Shike M. Modern nutrition in health and disease. 10.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
2. Tapiero H, Tew KD. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. Biomed. Pharmacother. 2003;57:399-411.
3. Vallee BL. Enzyme-based fiber optic zinc biosensor. In: Bertini I, Gary HB (eds.). A synopsis of zinc biology and pathology in zinc enzymes. Boston: Birkhauser; 1986.
4. Andreini C, Bertini I. A bioinformatics view of zinc enzymes. J. Inorg. Biochem. 2012;111:150-56.
5. Fukada T et al. Zinc homeostasis and signaling in health and diseases — zinc signaling. Journal of Biological Inorganic Chemistry. 2011;16:1123-34.
6. Chasapis CT et al. Zinc and human health: an update. Archives of Toxicology. 2011;86:1-14.
7. Prasad AS. Zinc: role in immunity, oxidative stress and chronic inflammation. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2009;12:646-52.
8. Dardenne M. Zinc and immune function. Eur. J. Clin. Nutr. 2002;56(Suppl.3):S20-S23.
9. Rink L, Kirchner H. Zinc-altered immune function and cytokine production. J Nutr. 2000;130:1407S-1411S.
10. Woodhouse LR, Lederer LJ, Lowe NM, King JC. The effects of zinc status on the osmotic fragility of human erythrocytes. In: Fischer PWF, Abbe MR, Cockell KA, Gibson RS (eds.). Trace elements in man and animals. Proceedings of the Ninth International Symposium on Trace Elements on Man and Animals. Ottawa: NRC Research Press; 1997.
11. Ryu MS et al. Proteomic analysis shows the upregulation of erythrocyte dematin in zinc-restricted human subjects. Am J Clin Nutr. 2012;95(5):1096-102.
12. Khanna R, Chang SH, Andrabi S, Azam M, Kim A, Rivera A et al. Headpiece domain of dematin is required for the stability of the erythrocyte membrane. Proc Natl Acad Sci USA. 2002;99:6637-42.
13. Oteiza PI. Zinc and the modulation of redox homeostasis. Free Radical Biology and Medicine. 2012;53:1748-59.
14. Krebs NF, Hambidge KM. Zinc metabolism and homeostasis: The application of tracer techniques to human zinc physiology. BioMetals. 2001;14:397-412.
15. Lee DY et al. Homeostasis of zinc in marginal human zinc deficiency: role of absorption and endogenous excretion of zinc. J Lab Clin Med. 1993;122:549-56.
16. Krebs NF et al. Absorption of exogenous zinc (Zn) and secretion of endogenous Zn in the human small intestine. FASEB J. 1998;12:A345.
17. Hambidge KM, Krebs NF, Miller L. Evaluation of zinc metabolism with use of stable-isotope techniques: implications for the assessment of zinc status. Am J Clin Nutr. 1998;68:410S–413S.
18. Chesters JK. Metabolism and biochemistry of zinc. In: Prasad AS (ed.). Clinical, biochemical, and nutritional aspects of trace elements. v.6. Current Topics in Nutrition and Disease. New York: Alan R. Liss; 1982.
19. Coneyworth LJ et al. Identification of the human ZTRE (zinc transcriptional regulatory element) – a palindromic protein-bin-

ding DNA sequence responsible for zinc-induced transcriptional repression. Journal of Biological Chemistry. 2012;287(43):36567-81.
20. Henriques GS, Hirata MH, Cozzolino SMF. Aspectos recentes da absorção e biodisponibilidade do zinco e suas correlações com a fisiologia da isoforma testicular da enzima conversora de angiotensina. Rev. Nutr. 2003;16(3):333-45.
21. Solomons NW, Cousins RJ. Zinc. In: Solomons NW, Rosenberg IH (eds.). Absorption and malabsorption of mineral nutrients. New York: Alan R. Liss; 1984.
22. Shrimpton R. Zinc deficiency: is it widespread but under-recognized? ACC/SCN News. 1993;9:24-27.
23. Gibson RS. Zinc nutrition in developing countries. Nutr Res Rev. 1994;7:151-73.
24. Sharif R et al. The role of zinc in genomic stability. Mutat. Res. 2012;733:111-21.
25. Zeisel SH. Nutrigenomics and metabolomics will change clinical nutrition and public health practice: insights from studies on dietary requirements for choline. The American Journal of Clinical Nutrition. 2007;86:542-48.
26. Müller M, Kersten S. Nutrigenomics: goals and strategies. Nat Rev Genet. 2003;4:315-22.
27. Smirnova IV et al. Zinc and cadmium can promote the rapid nuclear translocation of MTF-1. American Journal of Cell Physiology Chem. 2000;275:9377-84.
28. Liuzzi JP et al. Kruppel-like factor 4 regulates adaptive expression of the zinc transporter Zip4 in mouse small intestine. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2009;296:G517-23.
29. Seve M et al. In silico identification and expression of SLC30 family genes: Na expressed sequence tag data mining strategy for the characterization of zinc transporters tissue expression. BMC Genomics. 2004;5:32.
30. Lichten LA, Cousins RJ. Mammalian zinc transporters: nutritional and physiologic regulation. Annu Rev. Nutr. 2009;29:153-76.
31. Tuerk MJ, Fazel N. Zinc deficiency. Curr Opin Gastroenterol. 2009;25:136-43.
32. Kambe T, Yamaguchi-Iwai Y, Sasaki R, Nagao M. Overview of mammalian zinc transporters. Cell. Mol. Life Sci. 2004;61(1):49-68.
33. Huang L, Tepaamorndech S. The SLC30 family of zinc transporters – A review of current understanding of their biological and pathophysiological roles. Molecular Aspects of Medicine. 2013;34(2):548-60.
34. Liuzzi JP, Cousins RJ. Mammalian zinc transporters. Annu. Rev. Nutr. 2004;24:151-72.
35. McMahon RJ, Cousins RJ. Regulation of the zinc transporter ZnT-1 by dietary zinc. Proc. Natl. Acad. Sci. 1998;95(9):4841-46.
36. Sankavaram K, Freake HC. The effects of transformation and ZnT-1 silencing on zinc homeostasis in cultured cells. Journal of Nutritional Biochemistry. 2012;23:629-34.
37. Palmiter RD, Findley SD. Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. EMBO J. 1995;14:639-49.
38. Langmade SJ et al. The transcription factor MTF-1 mediates metal regulation of the mouse ZnT1 gene. J Biol Chem. 2000;275:34803-09.
39. Tsuda M et al. Expression of zinc transporter gene, ZnT-1, is induced after transient forebrain ischemia in the gerbil. J Neurosci. 1997;17:6678-84.
40. Chimienti F et al. Identification and cloning of a beta-cell-specific zinc transporter, ZnT-8, localized into insulin secretory granules. Diabetes. 2004;53:2330-37.
41. Henshall SM et al. Expression of the zinc transporter ZnT4 is decreased in the progression from early prostate disease to invasive prostate cancer. Oncogene. 2003;22:6005-12.
42. Kelleher SL, Lönnerdal B. Zn transporter levels and localization change throughout lactation in rat mammary gland and are regulated by Zn in mammary cells. J. Nutr. 2003;133:3378-85.
43. Huang L, Gitschier J. A novel gene involved in zinc transport is deficient in the lethal milk mouse. Nature Genetics. 1997;17(3):292-97.
44. Palmiter RD et al. ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles. Proc. Natl. Acad. Sci. 1996;93:14934-39.
45. Liuzzi JP, Blanchard RK, Cousins RJ. Differential regulation of zinc transporter 1, 2, and 4 mRNA expression by dietary zinc in rats. J. Nutr. 2001;131:46-52.
46. Chowanadisai W, Kelleher SL, Lonnerdal B. Zinc deficiency is associated with increased brain zinc import and LIV-1 expression and decreased ZnT-1 expression in neonatal rats. J. Nutr. 2005;135:1002-07.
47. Smidt K et al. SLC30A3 responds to glucose-and zinc variations in ß-cells and is critical for insulin production and in vivo glucose-metabolism during ß-cell stress. PLoS One. 2009;4(5):e5684.
48. Cragg RA et al. Homeostatic regulation of zinc transporters in the human small intestine by dietary zinc supplementation. Gut. 2005;54(4):469-78.
49. Huang L, Kirschke CP, Gitschier J. Functional characterization of a novel mammalian zinc transporter, ZnT6. J Biol Chem. 2002;277(29):26389-95.
50. Cousins RJ et al. A global view of the selectivity of zinc deprivation and excess on genes expressed in human THP-1 mononuclear cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 2003;100:6952-57.
51. Boesgaard TW et al. The common SLC30A8 Arg325Trp variant is associated with reduced first-phase insulin release in 846 non-diabetic offspring of type 2 diabetes patients—the EUGENE2 study. Diabetologia. 2008;51(5):816-20.
52. Wex T et al. Expression analysis of zinc transporters in resting and stimulated human peripheral blood mononuclear cells. Biomedical Reports. 2014;2(2):217-22.
53. Overbeck S et al. Intracellular zinc homeostasis in leukocyte subsets is regulated by different expression of zinc exporters ZnT-1 to ZnT-9. Journal of Leukocyte Biology. 2008;83(2):368-80.
54. Jeong J, Eide DJ. The SLC39 family of zinc transporters. Molecular Aspects of Medicine. 2013;34(2):612-19.
55. Milon B et al. Differential subcellular localization of hZip1 in adherent and non-adherent cells. FEBS Letters. 2001;507(3):241-46.
56. Gaither LA, Eide DJ. The human ZIP1 transporter mediates zinc uptake in human K562 erythroleukemia cells. J. Biol. Chem. 2001;276:22258-64.
57. Gaither LA, Eide DJ. Functional expression of the human hZIP2 zinc transporter. J Biol Chem. 2000;275(8):5560-64.
58. Wang K et al. A novel member of a zinc transporter family is defective in acrodermatitis enteropathica. Am J Hum Genet. 2002;71:66–73.
59. Dufner-Beattie J et al. The acrodermatitis enteropathica gene ZIP4 encodes a tissue-specific, zincregulated zinc transporter in mice. J Biol Chem. 2003;278:33474-81.
60. Weaver BP et al. Novel zinc-responsive post-transcriptional mechanisms reciprocally regulate expression of the mouse Slc39a4 and Slc39a5 zinc transporters (Zip4 and Zip5). Biol. Chem. 2007;388:1301-12.
61. Dufner-Beattie J et al. The adaptive response to dietary zinc in mice involves the differential cellular localization and zinc regula-

tion of the zinc transporters ZIP4 and ZIP5. Journal of Biological Chemistry. 2004;279(47):49082-90.
62. Taylor KM, Nicholson RI. The LZT proteins; the LIV-1 subfamily of zinc transporters. Biochem Biophys Acta Biomembr. 2003;1611(1):16-30.
63. Huang L et al. The ZIP7 gene (Slc39a7) encodes a zinc transporter involved in zinc homeostasis of the Golgi apparatus. Journal of Biological Chemistry. 2005;280(15):15456-63.
64. Aydemir TB et al. Zinc transporter ZIP8 (SLC39A8) and zinc influence IFN-gamma expression in activated human T cells. J. Leukoc. Biol. 2009;86:337-48.
65. Wang B et al. Enhanced cadmium-induced testicular necrosis and renal proximal tubule damage caused by gene-dose increase in a Slc39a8-transgenic mouse line. Am J Physiol Cell Physiol. 2007;292(4):C1523-35.
66. Matsuura W et al. SLC39A9 (ZIP9) regulates zinc homeostasis in the secretory pathway: characterization of the ZIP subfamily I protein in vertebrate cells. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2009;73:1142-48.
67. Wimmer U et al. Two major branches of anticadmium defense in the mouse: MTF-1/metallothioneins and glutathione. Nucleic Acids Res. 2005;33(18):5715-27.
68. Lichten LA et al. MTF-1-mediated repression of the zinc transporter Zip10 is alleviated by zinc restriction. PLoS One. 2011;6(6):e21526.
69. Martin AB et al. Gastric and colonic zinc transporter ZIP11 (Slc39a11) in mice responds to dietary zinc and exhibits nuclear localization. The Journal of Nutrition. 2013;143(12):1882-88.
70. Yu Y et al. Characterization of the GufA subfamily member SLC39A11/Zip11 as a zinc transporter. The Journal of Nutritional Biochemistry. 2013;24(10):1697-1708.
71. Kelleher SL et al. Mapping the zinc-transporting system in mammary cells: molecular analysis reveals a phenotype-dependent zinc-transporting network during lactation. J Cell Physiol. 2012;227:1761-70.
72. Chowanadisai W et al. Neurulation and neurite extension require the zinc transporter ZIP12 (slc39a12). PNAS. 2013;110:9903-08.
73. Daaboul D et al. Repletion of zinc in zinc-deficient cells strongly up-regulates IL-1β-induced IL-2 production in T-cells. Metallomics. 2012;4(10):1088-97.
74. Fukada T et al. The zinc transporter SLC39A13/ZIP13 is required for connective tissue development; its involvement in BMP/TGF-beta signaling pathways. PLoS ONE. 2008;3(11):e3642.
75. Giunta C et al. Spondylocheiro dysplastic form of the Ehlers-Danlos syndrome — an autosomal-recessive entity caused by mutations in the zinc transporter gene SLC39A13. Am J Hum Genet. 2008;82(6):1290-305, 2008.
76. Aydemir TB et al. Zinc transporter ZIP14 functions in hepatic zinc, iron and glucose homeostasis during the innate immune response (endotoxemia). PloSOne. 2012;10:e48679.
77. Liuzzi JP et al. Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells. Proc Natl Acad Sci. 2006;103:13612-17.
78. Bremner I, Beattie JH. Metallothionein and the trace minerals. Annu Rev Nutr. 1990;10:63-83.
79. Hamer DH. Metallothionein. Annu Rev Biochem. 1986;55:913-51.
80. West AK et al. Human metallothionein genes: structure of the functional locus at 16q13. Genomics. 1990;8(3):513-18.
81. Schmidt CJ, Hamer DH. Cell specificity and an effect of ras on human metallothionein gene expression. Proc Natl Acad Sci. 1986;83(10):3346-50.
82. Varshney U et al. Structure, organization, and regulation of human metallothionein IF gene: differential and cell-type-specific expression in response to heavy metals and glucocorticoids. Mol-Cell Biol. 1986;6(1):26-37.
83. Ryu MS et al. Genomic analysis, cytokine expression, and microRNA profiling reveal biomarkers of human dietary zinc depletion and homeostasis. PNAS. 2011;108(52):20970-75.
84. Allan AK et al. Lymphocyte metallothionein mRNA responds to marginal zinc intake in human volunteers. Brit J Nutr. 2000;84:747-56.
85. Heuchel R et al. The transcription factor MTF-1 is essential for basal and heavy metal-induced metallothionein gene expression. Embo J. 1994;13:2870-75.
86. Hambidge M. Biomarkers of trace mineral intake and status. J Nutr. 2003;133(suppl 3):948S-55S.
87. Cherian MG, Jayasurya A, Bay BH. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. Mutat Res. 2003;533(1):201-09.
88. Sato M, Bremner I. Oxygen free radicals and metallothionein. Free Radic Biol Med. 1993;14(3):325-37.
89. Feng W et al. Metallothionein transfers zinc to mitochondrial aconitase through a direct interaction in mouse hearts. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005;332(3):853-58.
90. Yoshida M et al. Measurement of radical-scavenging ability in hepatic metallothionein of rat using in vivo electron spin resonance spectroscopy. Toxicology, 2005;213(1):74-80.
91. Santon A et al. Evaluation of MT expression and detection of apoptotic cells in LEC rat kidneys. Biochim Biophys Acta. 2004;1688(3):223-31.
92. Maret W. The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox state. J Nutr. 2000;130:1455S-8S.
93. Fattman CL, Schaefer LM, Oury TD. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. Free Radical Biol Med. 2003;35(3):236-56.
94. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), MnSOD (SOD2) and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution and expression. Free Radic. Biol. Med. 2002;33(3):337-49.
95. Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function and diseases. Antioxidants & Redox Signaling. 2011;15(16):1583-1606.
96. Hitchler MJ, Domann FE. Regulation od CuZnSOD and its redox signaling potential: Implications for amyotrophic lateral sclerosis. Antioxidants & Redox Signlaling. 2014;20(10):1590-98.
97. Miao L, Clair D. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. Free Radical Biology & Medicine. 2009;47:344-56.
98. Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: Role in joint disease. Joint Bone Spine. 2007;74:324-29.
99. Levanon D, Lieman-Hurwitz J, Dafni N, Wigderson M, Sherman L, Bernstein Y et al. Architecture and anatomy of the chromosomal locus in human chromosome 21 encoding the Cu/Zn superoxide dismutase. EMBO J. 1985;4:77-84.
100. Kim HT, Kim YH, Nam JW, Lee HJ, Rho HM, Jung G. Study of the 5´-flanking region of human Cu/Zn superoxide dismutase. Biochem Biophys Commun. 1994;201:1526-33.
101. Jeney V, Itoh S, Wendt M, Gradek Q, Ushio-Fukai M, Harrison DG et al. Role of antioxidant-1 in extracellular superoxide dismutase function and expression. Circ. Res. 2005;96(7):723-29.
102. Enghild JJ, Thogersen IB, Oury TD, Valnickova Z, Hojrup P, Crapo JD. The heparin-binding domain of extracellular supero-

xide dismutase is proteolytically processed intracellularly during biosynthesis. J Biol Chem. 1999;274:14818-22.
103. Karlsson K, Lindahl U, Marklund SL. Binding of human extracellular superoxide dismutase C to sulphated glycosaminoglycans. J Biochem. 1988;256:29-33.
104. Tibell LA, Sethson I, Buevich AV. Characterization of the heparin-binding domain of human extracellular superoxide dismutase. Biochim Biophys Acta. 1997;1340:21-32.
105. Faraci FM, Didion SP. Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004;24:1367-73.
106. Nozik-Grayke E, Suliman HB, Piantadosi CA. Extracellular superoxide dismutase. Inter J Biochem Cell Biol. 2005;37:2466-71.
107. Folz RJ, Crapo JD. Extracellular superoxide dismutase (SOD3): tissue-specific expression, genomic characterization, and computer-assisted sequence analysis of the human EC SOD gene. Genomics. 1994;22:162-71.
108. Adachi T, Hara H, Yamada H, Yamazaki N, Yamamoto M, Sugiyama T et al. Heparin-stimulated expression of extracellular superoxide dismutase in human fibroblasts. Atherosclerosis. 2001;159:307-12.
109. Mackay JP, Crossley M. Zinc fingers are sticking together. Trends Biochem. 1998;23:1-4.
110. Nelson DL, Cox MM. Regulação da expressão gênica. In Nelson DL, Cox MM. Princípios de bioquímica de Lehninger. 5.ed. Porto Alegre: Sarvier; 2011.
111. Marreiro DN. Zinco. In: Cozzolino SMF, Cominetti C. Bases bioquímicas e fisiológicas da nutrição: nas diferentes fases da vida, na saúde e na doença. Barueri: Manole; 2013.
112. Nakaseko Y, Neuhaus D, Klug A, Rhodes D. Adjacent zinc finger motifs in multiple zinc finger peptides from SW15 form structurally independent flexibly linked domains. J Mol Biol. 1992;228:619-36.
113. Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. Cell. 2008;132(3):344-62.
114. Heyninck K, Beyaret R. The cytokine-inducible zinc finger protein A20 inhibits IL-1-induced NF-κB activation at the level of TRAF6. FEBS Lett. 1999;442:147-50.
115. Jaattela M, Mouritzen H, Elling F, Bastholm L. A20 finger protein inhibits TNF and IL-1 signaling. J. Immunol. 1996;156:1166-73.
116. Ma A, Malynn BA. A20: linking a complex regulator of ubiquitylation to immunity and human disease. Nature Reviews. 2012;12:774-85.
117. Prasad AS, Bin Bao MD, Frances WJB, Fazlul HS. Zinc-suppressed inflammatory cytokines by induction of A20-mediated inhibition of nuclear factor-kB. Nutrition. 2010;1-8.
118. Chu S, Ferro TJ. Sp1: Regulation of gene expression by phosphorylation. Gene. 2005;348:1-11.
119. Dynan WS, Tjian R. The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. Cell. 1983;35:79-87.
120. Afonso V, Santos G, Collin P, Khatib AM, Mitrovic DR, Lomri N et al. Tumor necrosis factor-alpha down-regulates human Cu/Zn superoxide dismutase 1 promoter via JNK/AP-1 signaling pathway. Free Radic. Biol. Med. 2006;41:709-21.
121. Baldelli S, Aquilano K, Rotilio G, Ciriolo MR. Glutationhe and copper, zinc superoxide dismutase are modulated by overexpression of neuronal nitric oxide synthase. Int. J. Biochem. Cell Biol. 2008;40:2660-70.
122. Zelko IN, Folz RJ. Sp1 e Sp3 transcription factors mediate trichostation A-induced and basal expression of extracellular superoxide dismutase. Free Radic Biol Med. 2004;37:1256-71.

Selênio 15

Bárbara Rita Cardoso
Cristiane Cominetti

INTRODUÇÃO

A essencialidade do selênio para seres humanos foi verificada apenas depois de mais de 150 anos de sua descoberta, por Berzelius, em 1817, em uma fábrica de ácido sulfúrico. No início do século XX, o mineral foi considerado tóxico e carcinogênico. Entretanto, pesquisas subsequentes demonstraram sua presença no sítio catalítico da enzima glutationa peroxidase (GPx). A reversão da distrofia muscular após a adição de selênio à alimentação de um paciente sob terapia de nutrição parenteral de longo prazo, bem como a descoberta da doença de Keshan – cardiomiopatia que afeta principalmente mulheres e crianças residentes em áreas da China com solos muito pobres em selênio – confirmaram a importância desse mineral para a manutenção da saúde humana.[1-4]

O selênio é encontrado na natureza em rochas, minerais, combustíveis fósseis e resíduos vulcânicos, o que reflete a distribuição diferenciada desse mineral entre os diversos tipos de solos. Normalmente, as concentrações do mineral encontradas nos solos são bastante variáveis – entre 0,01 mg/kg em solos pobres até mais de 1.000 mg/kg em solos seleníferos. Áreas litorâneas e regiões formadas por rochas vulcânicas incandescentes, calcárias, de carvão e de pirita apresentam solos mais ricos em selênio, enquanto solos compostos por rochas com quantidades altas de basalto e de granito são pobres nesse mineral. Essas diferenças observadas nas concentrações de selênio entre tipos de solos com formações geológicas distintas refletem na quantidade do mineral que será encontrada em alimentos de origem vegetal e, também, em carnes e outros produtos de origem animal, em função da pastagem ingerida pelos animais. A biodisponibilidade do selênio em produtos de origem vegetal também é afetada por fatores como pH, condições redox, quantidade de matéria orgânica no solo, presença de sulfato, atividade microbiana, textura, temperatura e compactação do solo, quantidade de chuvas e nível de irrigação.[1, 3, 5, 6]

A maior parte do selênio nos sistemas biológicos está na forma de aminoácidos, principalmente de selenocisteína e de selenometionina. A primeira é conhecida como o 21º aminoácido (Sec ou U), é incorporada nas selenoproteínas e contém selênio na forma de selenol (SeH), composto que apresenta propriedades químicas distintas (largamente ionizado em pH fisiológico e mais reativo) daquelas do grupamento tiol da cisteína, o que contribui para suas funções catalíticas nas selenoenzimas. Já a selenometionina apresenta selênio em sua estrutura, o qual está ligado covalentemente a dois átomos de carbono, característica que o torna menos ativo quimicamente em relação ao SeH presente na estrutura da selenocisteína. A selenometionina não parece apresentar funções distintas em relação ao aminoácido metionina.[7]

As formas químicas orgânicas e inorgânicas de selênio são encontradas tanto em alimentos quanto em suplementos alimentares. A selenometionina, a selenocisteína e a selênio-metilselenocisteína (Se-Met-Sec) representam as formas orgânicas. A selenometionina pode ser encontrada tanto em alimentos de origem vegetal e animal como em suplementos. A selenocisteína aparece principalmente em alimentos de origem animal.[8] As formas inorgânicas são representadas pelo selenito (SeO_3^{2-}) e selenato (SeO_4^{2-}), encontradas, principalmente, em suplementos alimentares e, em pequenas proporções, em alguns alimentos.[4, 9, 10]

O selênio entra na cadeia alimentar por meio de alimentos de origem vegetal e é incorporado em compostos que normalmente contêm enxofre. Assim, o selênio prove-

niente de fontes vegetais está na forma de selenometionina e, em menor proporção, de selenocisteína e outros análogos de aminoácidos sulfurados.[7] É importante, entretanto, destacar que espécies vegetais apresentam capacidade distinta de assimilação e de acumulação de selênio. Essas espécies podem ser classificadas em: (1) não acumuladoras de selênio (<100 mcg Se/g de peso seco), incluindo cereais, como trigo, aveia, cevada e centeio; (2) acumuladoras secundárias de selênio (até 1.000 mcg Se/g de peso seco), com destaque para os vegetais do gênero *Brassica,* como couve, brócolis e repolho, bem como do gênero *Allium,* incluindo alho, cebola e alho-poró; e (3) acumuladoras de selênio (até 40.000 mcg Se/g de peso seco), representadas unicamente pela árvore *Bertholletia excelsa*, que produz a castanha-do-brasil.[5, 11]

A biodisponibilidade do selênio depende inteiramente de sua forma química e, de maneira geral, os compostos orgânicos são mais absorvidos que os inorgânicos. Outros fatores que influenciam na biodisponibilidade do selênio incluem a quantidade ingerida de proteína e lipídio nas refeições, a presença de metais pesados (principalmente o mercúrio) na alimentação e o estado nutricional do indivíduo em relação ao mineral. De forma geral, a absorção do selênio é considerada elevada, com percentuais que variam entre 70 e 95%. As taxas médias de absorção da selenometionina e do selenito são de aproximadamente 84 e 98%, com doses de 200 mcg, respectivamente.[10, 12, 13]

Com relação ao metabolismo, o selenito de hidrogênio (H_2Se) é considerado o ponto central na interconversão das formas orgânica e inorgânica do selênio. O metabolismo do selênio está resumido na Figura 15.1.

Depois de ser absorvido e convertido a H_2Se, o selênio é transportado para o fígado. Acredita-se que a incorporação do selênio alimentar pela glutationa peroxidase extracelular (GPx-3) seja uma via de transporte

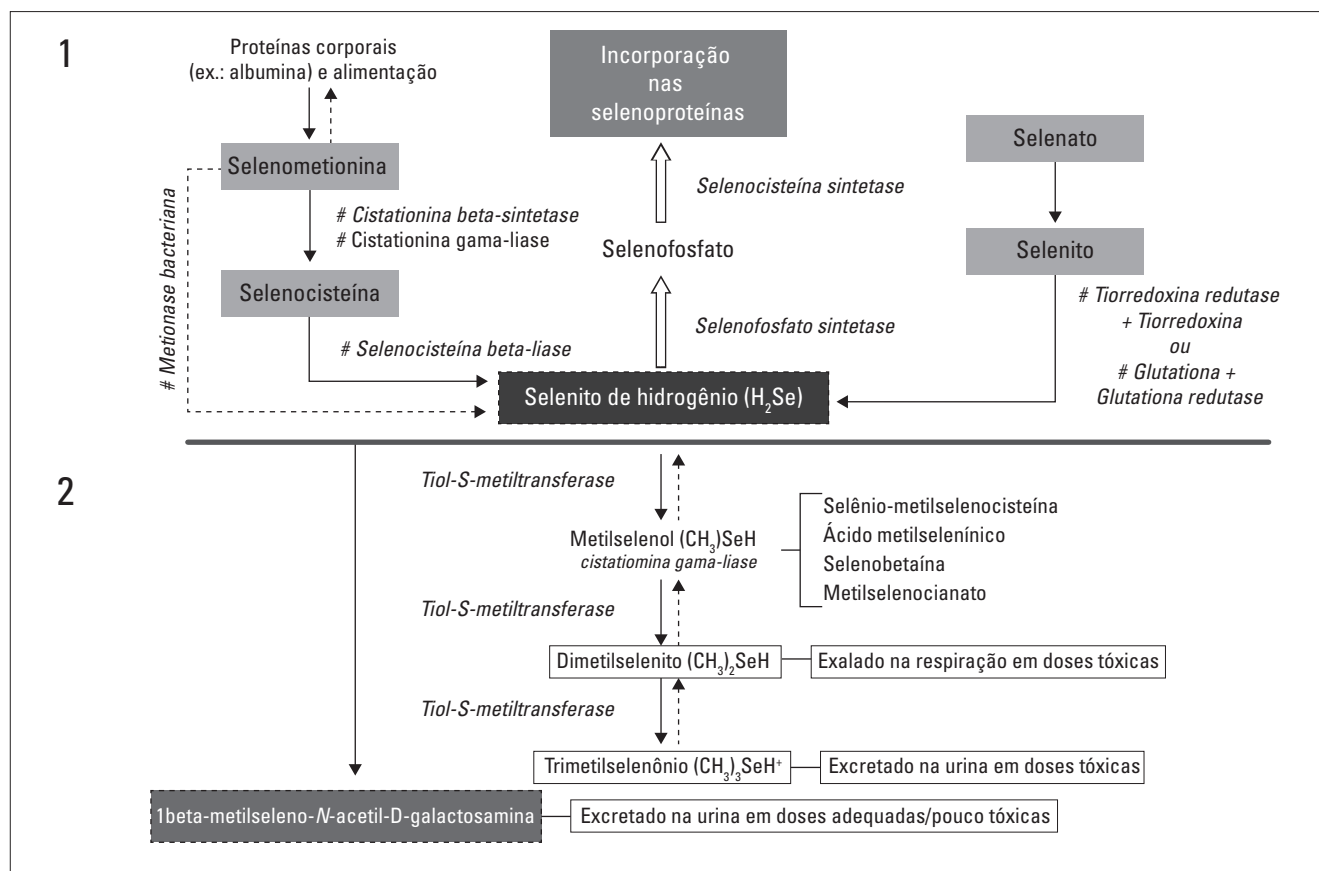



Figura 15.1 Metabolismo do selênio. Selenometionina, selenocisteína, selenato e selenito são transformados em selenito de hidrogênio (H_2Se), por meio da ação de enzimas específicas (indicadas por #). Tanto a selenometionina de origem alimentar quanto aquela proveniente do catabolismo proteico podem ser convertidas em selenocisteína por uma série de reações enzimáticas. O H_2Se poderá ser utilizado na síntese das diversas selenoproteínas (setas brancas) – 1. Diferentemente, a selênio-metilselenocisteína e os compostos sintéticos de selênio, entre eles a selenobetaína, o ácido metilselenínico e o metilselenocianato, são convertidos em metilselenol (CH_3SeH) por meio de reação enzimática catalisada pela cistationa gama-liase. Esse CH_3SeH poderá ser desmetilado e transformar-se em H_2Se. O H_2Se também pode ser metilado por meio de reações enzimáticas catalisadas por tióis-S-metiltransferases, gerando as formas mono (metilselenol), di (dimetilselenito) e trimetiladas (trimetilselenônio) – 2. Quando a ingestão alimentar de selênio é adequada, a maior via de excreção é a urinária e o principal composto eliminado é o selenoaçúcar 1-beta-metilseleno-N-acetil-D-galactosamina. **Fonte:** adaptada de Fairweather-Tait et al.,[14] Letavayová et al.,[15] Francesconi e Pannier,[16] Meuillet et al.,[17] Kobayashi et al.[18]

até o fígado, onde este é incorporado à selenoproteína P (SePP). É possível que existam também outros mecanismos de transporte do selênio para o fígado. Do fígado, o selênio é transportado para outros tecidos, principalmente na forma de SePP (até 60% do conteúdo total absorvido). Acredita-se, com base em estudos em modelos animais, que a entrada da SePP em tecidos ocorra por um processo de endocitose mediada por receptores, dentre os quais o receptor 2 de apolipoproteína E (apoER2) nos testículos e cérebro, e a megalina nos rins.[14]

SELENOPROTEÍNAS E SELENOPROTEOMA

O selênio exerce seu papel no organismo por meio de sua incorporação em selenoproteínas, as quais, por sua vez, desempenham funções importantes no metabolismo da tireoide, na modulação da resposta imune e na destoxificação, além de apresentarem papel antioxidante.[8, 19]

A incorporação do selênio às proteínas ocorre por meio da Sec, reconhecida como o 21° aminoácido e por se diferenciar da cisteína pela presença de um átomo de selênio no lugar do enxofre.[20] Entretanto, a utilização do selênio requer a formação de selenofosfato, a partir de selenito e de ATP, em um processo catalisado pela enzima selenofosfato sintetase 2.[21] Diferentemente de todos os outros aminoácidos, a Sec é diretamente sintetizada no seu próprio RNA transportador, denominado RNAt[Ser]Sec. Este faz a leitura do códon UGA para integração da Sec na sequência de aminoácidos que formarão as selenoproteínas. Entretanto, o códon UGA usualmente sinaliza o fim da tradução e, para que haja a sua recodificação para um códon *sense*, tem-se a presença de uma estrutura denominada sequência de inserção da Sec (SECIS), localizada na região 3'UTR (*untranslated region* – região não traduzida de um RNAm). O elemento SECIS é composto por dois componentes principais, um fator de elongação denominado fator de elongação eucariótico específico de Sec (eEFSec) e a proteína de ligação de SECIS 2 (SBP2). O eEFSec é responsável pelo recrutamento do RNAt[Ser]Sec e, juntamente com a SBP2, facilita a incorporação de Sec na cadeia proteica a ser formada. Já a SBP2 contém dois domínios que permitem ligação de alta afinidade e especificidade com os outros elementos de SECIS. Proteínas ligadoras de SECIS adicionais já foram identificadas, como a proteína ribossômica L30, que compõe a maquinaria basal de inserção de Sec; o fator de iniciação de tradução eucariótica 4a3 (eIF4a3) e a nucleolina, que juntos atuam como reguladores da síntese de selenoproteínas e podem contribuir com a hierarquia da expressão destas[21, 22] (Figura 15.2).

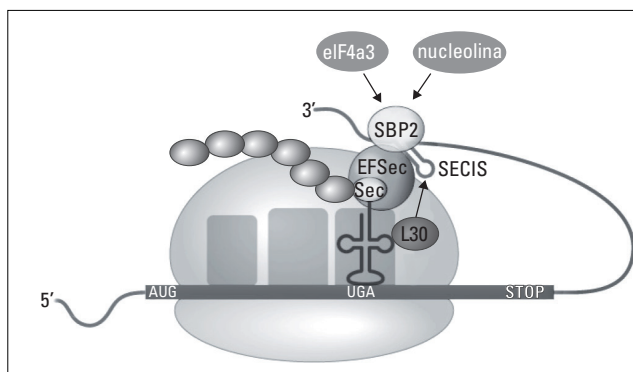



Figura 15.2 Síntese de selenoproteínas. O elemento SECIS (sequência de inserção da selenocisteína) na região 3'UTR do RNAm recruta a SBP2 (proteína de ligação de SECIS 2), a qual recruta o EFSec (fator de elongação eucariótico específico de selenocisteína) e o tRNASec. O complexo interage no ribossomo para decodificar o códon UGA (*stop* códon) como Sec (selenocisteína). Fatores que podem influenciar a eficiência da inserção da Sec incluem a L30 (proteína ribossomal L30), o eIF4a3 (fator de iniciação de tradução eucariótica 4a3) e a nucleolina. AUG: códon para metionina. **Fonte:** adaptada de Labunskyy et al.[22]

O selenoproteoma é composto por 25 genes, e cerca da metade das proteínas codificadas por eles já é conhecida. A família das GPx é composta por cinco enzimas com capacidade antioxidante relacionada à redução de peróxido de hidrogênio, hidroperóxidos orgânicos e fosfolipídio hidroperóxido (somente a GPx-4). Essas enzimas apresentam expressão tecido-específica, sendo que a GPx-1 é encontrada no citosol de todas as células e apresenta expressão mais elevada em tecidos com alta produção de peróxidos, como rins, fígado e eritrócitos; a GPx-2 é encontrada principalmente em órgãos do sistema digestório; a GPx-3 é encontrada predominantemente nos rins; e a GPx-4 é encontrada principalmente nos testículos, nos espermatozoides, no coração, no fígado, nos rins e no cérebro, nas isoformas mitocondrial, citosólica e nuclear. Diferentemente das outras GPx, a GPx-4 é capaz de reduzir diretamente hidroperóxidos formados a partir de fosfolipídios e colesterol. A GPx-6 foi identificada no epitélio olfatório e em tecidos embrionários.[23-27]

A família das tiorredoxina redutases (TrxR) é caracterizada por três isoformas expressas no citosol ou núcleo (TrxR-1), nas mitocôndrias (TrxR-2) e nos testículos (TrxR-3). Essas enzimas catalisam a redução de tiorredoxina ou outras proteínas com a utilização de NADPH e, assim, compõem o maior sistema redox celular de organismos vivos.[12, 14]

A SePP é o principal transportador de selênio, sendo responsável por até 60% do total desse mineral no soro. Tal função deve-se à presença de dez resíduos de Sec em sua estrutura, dos quais um se localiza no domínio N-terminal e nove encontram-se no resíduo C-terminal.[28] A SePP também é conhecida por seu papel

antioxidante, uma vez que inibe a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e é capaz de reduzir hidroperóxidos com a doação de elétrons a partir da glutationa ou da tiorredoxina.[14, 29, 30]

As iodotironinas deiodinases constituem outra família de selenoproteínas essencial para o metabolismo da tireoide. As isoformas I e II ativam o hormônio tireoidiano T_4, realizando uma deiodinação na posição 5' em sua estrutura, enquanto as deiodinases I e III participam da etapa de inativação desse hormônio pela deiodinação na posição 5.[14]

A selenofosfato sintetase 2 catalisa a síntese de selenofosfato, elemento chave que se une a um resíduo de serina, formando uma Sec para posterior incorporação às selenoproteínas.[8] A metionina-R-sulfóxido redutase 1, também conhecida como selenoproteína R, catalisa a redução de resíduos de metionina oxidados, contribuindo assim para o reparo de proteínas oxidadas e atuando como parte do sistema redox. Essa selenoenzima também carrega um átomo de zinco ligado a quatro resíduos de cisteína e parece exercer papel estrutural.[31]

As selenoproteínas M (SeM) e 15 (Se15) caracterizam-se por serem oxidorredutases tiol-dissulfido. A Se15 forma um complexo com UDP-glicose:glicoproteína glicosiltransferase (UGGT), que auxilia o dobramento de glicoproteínas. Além disso, essa selenoproteína parece catalisar a isomerização ou a redução de pontes dissulfido.[32, 33] Embora a SeM compartilhe 31% da sequência da Se15, essa selenoproteína ainda não tem sua função elucidada.[21]

As selenoproteínas S (SeS) e K (SeK) apresentam domínio transmembrânico e, embora suas funções ainda não estejam bem descritas, acredita-se que as duas apresentem características semelhantes no que diz respeito à estrutura, à capacidade de ligação a proteínas e à participação em processos envolvidos na regulação do estresse do retículo endoplasmático.[21, 34] Outras selenoproteínas já identificadas ainda não têm suas funções específicas reconhecidas, incluindo as H, I, O, T, V e W.

NUTRIGENÉTICA E SELÊNIO

A expressão e a atividade de selenoproteínas, bem como a biodisponibilidade de selênio, podem ser influenciadas por variações genéticas não somente nos genes que codificam as selenoproteínas, mas também por alterações em regiões do DNA relacionadas à maquinaria de incorporação de selênio nas selenoproteínas, como o gene que codifica a SBP2 ou o gene do eF-Sec, bem como em genes envolvidos com o transporte e distribuição tecidual de selênio, como é o caso daquele que codifica a SePP. Além disso, as variações genéticas que ocorrem nas regiões 3'UTR são de extrema importância, uma vez que a incorporação de Sec ocorre nessa região.[35, 36]

Existem algumas mutações raras que resultam em doenças genéticas graves relacionadas ao selênio, como é o caso de mutações no gene da selenoproteína N, as quais causam distrofia muscular congênita. Mutações no gene que codifica a SBP2 estão relacionadas a uma alteração caracterizada por função prejudicada da glândula tireoide e também a outra síndrome caracterizada por falha na espermatogênese, distrofia muscular, sensibilidade aumentada à radiação ultravioleta, estresse oxidativo elevado e expressão reduzida de todas as selenoproteínas.[35, 37, 38]

Especificamente em relação aos polimorfismos de nucleotídeo único (SNP), existem diversas descrições em genes relacionados ao metabolismo do selênio. Grande número de evidências dá suporte à alegação de que polimorfismos em genes que codificam as GPx, cuja principal característica é a capacidade antioxidante, são funcionais, afetando a atividade dessas enzimas. Um SNP bastante estudado é o Pro198Leu no gene da GPx-1 (rs 1050450), o qual foi detectado em 1999 em indivíduos suecos e finlandeses. Esse SNP refere-se a uma troca de citosina por timina na posição 593 do éxon 2, que resulta na substituição de uma prolina por uma leucina no códon 198.[39, 40] Foi determinada a atividade eritrocitária da GPx em todos os pacientes analisados e não foram encontradas diferenças em função dos genótipos, sugerindo alta estabilidade da enzima variante.[39] Entretanto, Ravn-Haren et al.[41] analisaram a relação entre a presença desse polimorfismo e a atividade eritrocitária da GPx em mulheres dinamarquesas com e sem diagnóstico de câncer de mama e verificaram redução de 5% na atividade da enzima para cada cópia do alelo variante. Clones de células de câncer de mama que expressavam exclusivamente o alelo selvagem ou o variante foram construídos para avaliar a diferença de resposta à suplementação de selênio entre os genótipos. Aqueles que carreavam o alelo variante apresentaram menor estímulo da atividade da GPx-1 durante a suplementação de selênio.[41, 42]

Indivíduos residentes em áreas deficientes em selênio na China com pelo menos um alelo variante em relação ao SNP Pro198Leu apresentaram risco 123% maior de desenvolver a doença de Keshan em comparação aos homozigotos selvagens. Além disso, a frequência de alelos variantes foi maior nos pacientes residentes nas áreas endêmicas do que em controles não residentes em tais áreas, e foi também inversamente relacionada à concentração sanguínea de selênio. Em comparação aos indivíduos homozigotos selvagens, aqueles que carreavam um ou dois alelos variantes também apresentaram atividade da GPx-1 e concentração de selênio significativamente

inferiores. Ainda, a atividade da GPx-1 e a responsividade à suplementação (doses entre 0,03 e 0,12 μg/mL) de selênio (como selenito de sódio) foram significativamente maiores em cardiomiócitos de ratos recém-nascidos transfectados com o alelo selvagem.[43]

Ainda com relação ao SNP Pro198Leu, em um estudo brasileiro, realizado com 37 mulheres com obesidade grau III (índice de massa corporal, IMC ≥ 40 kg/m^2), não foram observadas diferenças significativas na concentração sanguínea de selênio e na atividade eritrocitária total da GPx entre os diferentes genótipos, mesmo após a ingestão de uma castanha-do-brasil (cerca de 290 μg de selênio) ao dia durante oito semanas. Entretanto, as participantes que carreavam pelo menos um alelo variante apresentaram atividade eritrocitária da GPx 16,4 e 15,5% menor que as homozigotas selvagens nas fases pré e pós-suplementação, respectivamente. Ainda, mulheres que carreavam um ou dois alelos variantes apresentaram danos em DNA significativamente maiores em relação às homozigotas selvagens, e apenas estas últimas apresentaram redução dos danos após a suplementação de castanha-do-brasil. Nas participantes que carreavam dois alelos variantes, os danos em DNA se correlacionaram negativamente com a atividade da GPx na fase pós-suplementação, o que não ocorreu naquelas heterozigotas e homozigotas selvagens.[44]

Diferenças significativas na concentração plasmática de selênio e na atividade da GPx-1 entre os genótipos relacionados ao SNP Pro198Leu também não foram encontradas em indivíduos poloneses saudáveis. Entretanto, a atividade da GPx-1 se correlacionou positivamente com a concentração plasmática de selênio apenas nos indivíduos carreadores do alelo selvagem, indicando importância funcional do polimorfismo quanto ao direcionamento de selênio para a síntese de selenoproteínas.[45]

Estudos têm demonstrado que a presença do alelo variante em relação ao SNP Pro198Leu, além de estar relacionada a diferenças na atividade enzimática, predispõe os indivíduos a algumas doenças específicas, como alguns tipos de câncer, síndrome metabólica e doença de Keshan.[35, 46, 47] Nas populações indiana e chinesa, por exemplo, uma metanálise com mais de 50 mil pacientes e 12 variantes genéticas verificou que o SNP Pro198Leu foi significativamente associado com maior risco de desenvolvimento de doença arterial coronariana.[48]

Com relação à GPx-3, foram identificados oito SNP na região promotora do gene (−942 A→C; −927 T→C; −861 A→T; −568 T→C; −518 T→C; −302 A→T; −284 T→A; e −65 T→C), agrupados em dois haplótipos principais (H1 e H2). Demonstrou-se que o haplótipo H2 reduz a atividade transcricional do gene, comprometendo sua expressão e as atividades antioxidante e antitrombótica relacionadas à enzima. Esse haplótipo foi também independentemente associado a risco elevado de acidente vascular encefálico isquêmico em adultos jovens e crianças brasileiras, bem como de trombose venosa cerebral em homens e mulheres de mesma nacionalidade.[49, 50]

Na região 3’UTR do gene da GPx-4, especificamente na posição 718, ocorre a substituição de uma timina por uma citosina (T→C) (rs713041). Evidências sugerem que esse SNP tenha consequências funcionais e esteja relacionado a alterações no padrão de expressão de outras selenoproteínas, como a GPx-1, e possivelmente com alterações da resposta inflamatória e no risco de câncer.[51] No estudo Selgen demonstrou-se que esse SNP apresenta consequências funcionais especialmente importantes quando a ingestão alimentar de selênio é marginal. Indivíduos homozigotos para a variante apresentaram melhor manutenção da atividade da GPx-4 e da concentração da enzima em linfócitos em relação aos homozigotos selvagens após duas, quatro e seis semanas de suplementação de selenito de sódio (100 mcg/dia). Especulou-se acerca do papel dos hormônios esteroides na regulação pós-transcricional das selenoproteínas, uma vez que os efeitos foram dependentes do sexo – observados apenas em mulheres. A atividade de outras selenoproteínas também foi afetada pela presença do polimorfismo, como foi o caso da GPx-3 e da TrxR-1, que apresentaram atividade aumentada nos indivíduos CC em comparação aos TT após a suplementação.[52]

Polimorfismos no gene da SePP podem alterar a distribuição de selênio para o cérebro, a próstata, os testículos e o cólon, afetando a biodisponibilidade do mineral nesses órgãos. Já se demonstrou que dois polimorfismos no gene da SePP1 – uma substituição G→A na posição 25191 da região 3’UTR (rs7579) e o SNP Ala234Thr (rs3877899) – afetam o metabolismo de selênio, influenciando o padrão das isoformas plasmáticas da SePP e as atividades de várias selenoproteínas em linfócitos, eritrócitos e plasma em resposta à suplementação com o mineral.[51, 53]

Polimorfismos com impacto funcional na atividade enzimática das deiodinases têm sido detectados. Com relação à deiodinase tipo I, três SNP são conhecidos como candidatos potencialmente associados com processos fisiológicos e patológicos em humanos – o rs2235544, localizado em um íntron; o C785T (rs11206244) e o A1814G (rs12095080), localizados na região 3’UTR do RNAm. Os SNP Gly3Asp (rs12885300) e Thr92Ala (rs225014) nos éxons 1 e 2 do gene da deiodinase tipo II têm sido estudados, ainda com resultados conflitantes. Até o momento, as implicações de variações genéticas relacionadas à deiodinase tipo III são escassas. Possíveis efeitos dessas variações na atividade da enzima podem ser afetados por pro-

cessos epigenéticos, uma vez que o gene está localizado em uma região cromossômica de *imprinting* genético. De forma geral, os polimorfismos no gene da deiodinase tipo I são fortemente relacionados com as concentrações séricas de hormônios tireoidianos, com a produção de fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) e com risco de desenvolvimento de depressão. As variações genéticas da deiodinase tipo II também têm sido correlacionadas com concentrações de hormônios da tireoide, resistência à ação da insulina, transtorno bipolar e bem-estar psicológico, retardo mental (em áreas deficientes em iodo), hipertensão arterial e risco para osteoartrite. Por outro lado, SNP no gene da deiodinase tipo III não foram relacionados com variações interindividuais nas concentrações séricas de hormônios tireoidianos, apenas com risco aumentado para osteoartrite. Há, entretanto, necessidade de determinar as interações entre as deficiências de iodo e/ou selênio e as variações genéticas dessas deiodinases sobre os efeitos na relação saúde/doença.[54]

Variações genéticas em outras selenoproteínas também têm sido descritas, como é o caso da selenoproteína S. Dentre os SNP avaliados, o –105 G>A (rs28665122) na região promotora do gene foi associado com o aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias (interleucinas – IL – 6 e 1beta e fator de necrose tumoral alfa – TNF-alfa) em indivíduos americanos e mexicanos e a presença do alelo variante reduziu significativamente a expressão da proteína em células HepG2 após a exposição do retículo endoplasmático a agentes estressores.[55] Esse SNP também foi significativamente associado a maior risco de câncer colorretal em mulheres coreanas e em pacientes da República Tcheca.[56, 57]

NUTRIGENÔMICA E SELÊNIO

A oferta de selênio modula a expressão das diferentes selenoproteínas, uma vez que há hierarquia na resposta à ingestão do mineral. Assim, observa-se que algumas selenoproteínas respondem rapidamente à deficiência de selênio com diminuição da sua atividade, enquanto outras se mantêm estáveis sob deficiência moderada e apenas apresentam redução de atividade mediante depleção prolongada e notável.[58] Nesse sentido, a deiodinase 1 encontra-se no topo da hierarquia por ser a selenoproteína menos vulnerável à deficiência de selênio. Dentro da família das GPx, verifica-se prioridade de incorporação de selênio para as GPx-2 e 4 em relação às GPx-1 e 3, enquanto a SePP encontra-se em posição intermediária.[59, 60] Do mesmo modo, ocorre hierarquia quanto aos órgãos e tecidos em relação ao *status* de selênio. Nesse sentido, o cérebro é o último órgão a ser depletado em casos de deficiência de selênio e, na repleção, é o primeiro a reestabelecer as concentrações adequadas, o que revela a importância do mineral no funcionamento cerebral.[61, 62]

Uma provável interpretação para essa hierarquia entre as selenoproteínas sugere que elas são classificadas conforme a importância do seu desempenho para o organismo, e alguns mecanismos pelos quais o selênio alimentar afeta a síntese de selenoproteínas são propostos. Inicialmente, algumas selenoproteínas, como a GPx-1, são alvo do mecanismo de decaimento do RNAm (NMD, *nonsense-mediated mRNA decay*), em que, sob condições limitadas de selênio, o códon UGA é reconhecido prematuramente como códon de terminação, resultando em degradação do RNA. Também a diferença de comprimento da região 3'UTR e do número de nucleotídeos entre o códon UGA e o elemento SECIS parecem influenciar significativamente a capacidade de diferentes componentes de se ligarem às proteínas necessárias para a formação da SECIS. Outra possível explicação é a capacidade de metilação do Um34 – grupo de ribose metilada na uridina localizada na posição 34 do RNAt[Ser]Sec –, etapa da maturação do RNAt[Ser]Sec que pode ser alterada em decorrência de algumas mutações. Sugere-se que haja duas isoformas de Um34: a primeira, denominada 5-metoxicarbonilmetil-2'-O-metiluridina (mcm^{5}Um), é mobilizada para a expressão de selenoproteínas relacionadas ao estresse oxidativo, como as GPx, enquanto a isoforma 5-metoxicarbonilmetil-uridina (mcm^{5}U) parece não estar relacionada à expressão de selenoproteínas específicas. Assim, acredita-se que a utilização distinta dessas duas isoformas contribui para a regulação da síntese de selenoproteínas.[51,63]

Yan et al.[64] avaliaram o perfil de expressão de selenoproteínas em condroblastos e condrócitos de camundongos e de seres humanos em função do tratamento com diferentes concentrações de selênio. Quando submetidas a baixas concentrações do mineral, as células animais apresentaram redução significativa de RNAm das selenoproteínas W, H, I e GPx-1. Além dessas, a expressão de TrxR-1, TrxR-2, SeM, SeT e SeN foi reduzida cerca de 80% em relação ao padrão. Em contrapartida, a expressão da selenofosfato sintase 2 e das selenoproteínas O, R e S foi positivamente regulada. Já as células humanas, quando tratadas com concentrações adequadas de selênio, apresentaram aumento na expressão de GPx-1, GPx-3 e das selenoproteínas H, N, S, P e W, enquanto a expressão de selenofosfato sintase 2 e da SeO foi aumentada. Em contraste, os níveis de RNAm de GPx-2, GPx-4, deiodinases II e III, TrxR-1, TrxR-2, TrxR-3, Se15, SeI, SeK, SeM, SeR, SeS, SeV e SeT não foram afetados pela concentração de selênio.

A suplementação com 100 mcg de selenito de sódio, durante seis meses, em adultos alterou o padrão de

expressão de selenoproteínas em linfócitos de sangue periférico. Nesse estudo, os autores observaram que a expressão da Se15 e da SeK aumentou significativamente, sugerindo que essas selenoproteínas são bastante sensíveis ao suprimento de selênio.[65] Por outro lado, em estudo com animais que receberam ração deficiente em selênio, a análise da mucosa do cólon permitiu verificar que as selenoproteínas mais afetadas negativamente foram GPx-1, SeH, SeW e SeM, enquanto nos leucócitos, além dessas, a Se15 também teve sua expressão significativamente reduzida.[66, 67]

Estudos que avaliaram o impacto de selênio proveniente de fontes alimentares sobre a expressão gênica são escassos. Entretanto, Cardoso et al.[68] avaliaram os efeitos do polimorfismo Pro198Leu no gene da GPx-1, e dos polimorfismos Ala234Thr e rs7579 no gene da SePP, sobre a resposta à ingestão de castanha-do-brasil em idosos com comprometimento cognitivo leve. Nesse estudo, os vinte participantes receberam, diariamente, uma castanha-do-brasil, que continha aproximadamente 290 mcg de selênio. Após os 6 meses de intervenção, observou-se que as variações genéticas não exerceram influência nas modificações das concentrações de selênio plasmático e eritrocitário, bem como de malondialdeído. Porém, com relação à atividade eritrocitária da GPx, apenas aqueles indivíduos com genótipo variante em relação ao SNP rs7579 e com genótipo selvagem referente ao SNP Ala234Thr não apresentaram aumento significativo. O padrão de expressão da GPx-1 e da SePP também foi diferente entre os genótipos: indivíduos que carreavam o alelo variante do SNP Pro198Leu foram mais responsivos à ingestão de castanha-do-brasil quanto ao aumento da expressão de GPx-1 e SEPP em células do sangue (leucócitos totais). Também observou-se que a presença do alelo variante em relação ao SNP rs7579 e do genótipo selvagem do SNP Ala234Thr foi associada com redução da expressão gênica de GPx-1 e aumento da expressão de SEPP após a intervenção. Embora esse tenha sido um estudo com pequeno número de indivíduos, demonstrou a importância da avaliação da influência de componentes da alimentação na modulação da expressão de genes importantes para o metabolismo de selênio.

O selênio proveniente da alimentação é capaz de alterar também a expressão de outros genes além daqueles que codificam selenoproteínas, denominados alvos *downstream*.[51] Desse modo, reconhece-se que o mineral tem efeito sistêmico, impactando em múltiplos mecanismos que podem também ser modulados conforme a oferta de outros micronutrientes.[69]

Nesse sentido, Reszka et al.[70] observaram que a baixa ingestão de selênio, identificada pela baixa concentração plasmática desse mineral, em indivíduos saudáveis poloneses foi associada à expressão aumentada de vários genes regulados pelo fator de transcrição Nrf-2, especialmente *GSTP1*, *PRDX1* e *SOD2* em linfócitos do sangue periférico. Tais genes codificam enzimas que participam ativamente do sistema antioxidante, convertendo o ânion superóxido ou reduzindo os peróxidos de hidrogênio.

A oferta de selênio também parece modular a expressão de células do sistema imune. Em camundongos deficientes em selênio, a resposta do tipo T *helper* 2 (Th2) foi reduzida quando comparada àquela observada nos animais com ingestão adequada de selênio. A recuperação do *status* de selênio nesses animais associou-se com menor vulnerabilidade à infecção por parasita em decorrência da maior expressão de genes associados à resposta Th2 no intestino.[71] Já em ovelhas, quando suplementadas com selênio orgânico, verificou-se aumento do RNAm da L-selectina, do receptor de interleucina 8 (IL8) e do receptor do tipo toll 4 (TLR4), proteínas envolvidas na resposta imune inata.[72]

O selênio é capaz de modular também genes relacionados à síntese celular, como aqueles que codificam o eiF4e, a quinase p70S6, algumas proteínas ribossômicas e proteínas associadas: à sinalização da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR); à inflamação, como os que codificam o TNF-alfa e o fator nuclear kappa B (NF-kB); à regulação do ciclo celular (sinalização Wnt); e à degradação de proteínas pelo proteassoma.[73]

Estudos que buscam avaliar a biodisponibilidade das diversas formas de selênio ganharam nova perspectiva com o estudo de Barger et al.,[74] que utilizou técnicas de nutrigenômica para avaliar os efeitos da suplementação de selenometionina, de selenito de sódio e de selênio derivado de levedura em animais depletados. Os pesquisadores verificaram que, embora as três fontes de selênio tenham recuperado a deficiência instalada de maneira semelhante, impactaram de forma distinta na regulação da expressão de diferentes genes, alterando determinadas funções celulares. No músculo gastrocnêmio, a expressão da classe de genes relacionados à membrana interna mitocondrial foi regulada positivamente pelas três formas de selênio. O selênio derivado de levedura causou regulação negativa da expressão desses genes no córtex cerebral, assim como a selenometionina. Do mesmo modo, em nível intestinal, o selênio de levedura e o selenito de sódio também promoveram regulação negativa da expressão dessa classe de genes. Já a selenometionina promoveu regulação positiva da expressão desses genes no fígado e no intestino. Com relação às selenoproteínas, as três formas de selênio modularam, de maneira robusta e consistente, a expressão de uma categoria funcional de genes chamada *selenium binding,* definida como uma classe que interage seleti-

vamente e de forma não covalente com o selênio. A expressão hepática de dois genes pertencentes a essa classe, o da GPx-1 e o da TrxR-2, aumentou cerca de 5 e 2 vezes, respectivamente, em nível intestinal, muscular e hepático. A atividade hepática total da GPx também se elevou em cerca de 5 vezes após a ingestão das três diferentes formas químicas de selênio. Já a atividade hepática da TrxR aumentou cerca de 3 vezes após a ingestão da dieta que continha selenometionina e em níveis intermediários após a ingestão de selenito de sódio e de selênio de levedura. Além disso, o selênio derivado de levedura foi a forma que melhor se associou ao padrão de expressão gênica relacionado com menores danos ao DNA. Esse trabalho mostra que as diferentes fontes de selênio podem gerar impactos distintos em diversos genes, contribuindo para respostas sistêmicas conflitantes.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Até o momento, diversos estudos têm evidenciado a funcionalidade de SNP em genes de selenoproteínas. Entretanto, a pesquisa das interações entre variações genéticas e o metabolismo do selênio tem sido limitada a SNP individuais e à avaliação de determinados parâmetros fisiológicos. Dessa forma, a compreensão dos efeitos da associação de vários polimorfismos no metabolismo do mineral e na relação saúde/doença é bastante limitada. Do mesmo modo, estudos que elucidem os efeitos da ingestão de selênio sobre a modulação da expressão de diferentes genes são escassos e ainda não conseguem esclarecer todos os mecanismos envolvidos na hierarquia do selênio, bem como a influência desse mineral sobre outras vias metabólicas.

É de extrema importância, portanto, que se realizem estudos mais abrangentes, considerando possíveis fatores de interferência como etnia, sexo, IMC, estilo de vida e fatores relacionados à alimentação, na determinação da influência dos fatores genéticos sobre o metabolismo do selênio e das vias a que ele está associado.[51]

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alissa EM, Bahijri SM, Ferns GA. The controversy surrounding selenium and cardiovascular disease: a review of the evidence. Med Sci Monit. 2003;9(1):RA9-18.
2. Brown KM, Arthur JR. Selenium, selenoproteins and human health: a review. Public Health Nutr. 2001;4(2B):593-99.
3. Oldfield JE. Selenium word atlas (Update edition). Selenium – Tellurium Development Association (STDA); 2002.
4. Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. Science. 1973;179:588-90.
5. Rayman MP. Food-chain selenium and human health: emphasis on intake. Br J Nutr. 2008;100(2):254-68.
6. Hartikainen H. Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human health. J Trace Elem Med Biol. 2005;18:309-18.
7. Sunde R. Selenium. In: Ross CA, Caballero B, Cousins RJ, Tucker KL, Ziegler TR (eds.). Modern nutrition in health and disease. 11.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2014.
8. Navarro-Alarcon M, Cabrera-Vique C. Selenium in food and the human body: A review. Sci Total Environ. 2008;400:115-41.
9. Ortuño J, Ros G, Periago MJ, Martinez C, López G, Rodrigo J. Importancia nutricional del selenio. Arch Latinoam Nutr. 1987;47(1):6-13.
10. Sunde RA. Selenium. In: O'Dell BL, Sunde RA (eds.). Handbook of nutritionally essential mineral elements. New York: Marcel Dekker; 1997.
11. Terry N, Zayed AM, De Souza MP, Tarun AS. Selenium in higher plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 2000;51:401-32.
12. Papp LV, Lu J, Holmgren A, Khanna KH. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. Antioxid Redox Signal. 2007;9:755-806.
13. Rayman MP. The importance of selenium to human health. Lancet. 2000;356:233-41.
14. Fairweather-Tait SJ, Bao Y, Broadley MR, Collings R, Ford D, Hesketh JE et al. Selenium in human health and disease. Antioxid Redox Signal. 2011;14(7):1337-83.
15. Letavayová L, Vlcková V, Brozmanová J. Selenium: from cancer prevention to DNA damage. Toxicology. 2006;227:1-14.
16. Francesconi KA, Pannier F. Selenium metabolites in urine: a critical overview of past work and current status. Clin Chem. 2004;50(12):2240-53.
17. Meuillet E, Stratton S, Cherukuri DP, Goulet A, Kagey J, Porterfield B et al. Chemoprevention of prostate cancer with selenium: an update on current clinical trials and preclinical findings. J Cel Biochem. 2004;91:443-58.
18. Kobayashi Y, Ogra Y, Ishiwata K, Takayama H, Aimi N, Suzuki KT. Selenosugars are key and urinary metabolites for selenium excretion within the required to low-toxic range. Proc Natl Acad Sci USA. 2002;99(25):15932-36.
19. Holben D, Smith A. The diverse role of selenium within selenoproteins: a review. J Am Diet Assoc. 1999;99:836-43.
20. Hatfield DL, Tsuji PA, Carlson BA, Gladyshev VN. Selenium and selenocysteine: roles in cancer, health, and development. Trends Biochem Sci. 2014;39(3).
21. Roman M, Jitaru P, Barbante C. Selenium biochemistry and its role for human health. Metallomics. 2014;6(1):25-54.
22. Labunskyy VM, Hatfield DL, Gladyshev VN. Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles. Physiol Rev. 2014;94(3):739-77.
23. Lei XG, Cheng WH, McClung JP. Metabolic regulation and function of glutathione peroxidase-1. Annu Rev Nutr. 2007; 27:41-61.
24. Herbette S, Roeckel-Drevet P, Drevet JR. Seleno-independent glutathione peroxidases: More than simple antioxidant scavengers. FEBS J. 2007;274:2163-80.
25. Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. Biomed Pharmacother. 2003; 57:134-44.
26. Sarewko MM, Popa C, Dahler AL, Smith L, Strutton GM, Coman W et al. Alterations in gene expression and activity during squamous cell carcinoma development. Cancer Res. 2002; 62:3759-65.

27. Florian S, Wingler K, Schmehl K, Jacobasch G, Kreuzer OJ, Meyerhof W et al. Cellular and subcellular localization of gastrointestinal glutathione peroxidase in normal and malignant human intestinal tissue. Free Radic Res. 2001;35:655-63.
28. Ferguson LR, Karunasinghe N, Zhu S, Wang AH. Selenium and its' role in the maintenance of genomic stability. Mut Res. 2012;733:100-10.
29. Steinbrenner H, Alili L, Bilgic E, Sies H, Brenneisen P. Involvement of selenoprotein P in protection of human astrocytes from oxidative damage. Free Radic Biol Med. 2006;40:1513-23.
30. Burk RF, Hill KE. Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis. Annu Rev Nutr. 2005;25:215-35.
31. Kryukov GV, Kumar RA, Koc A, Sun Z, Gladyshev VN. Selenoprotein R is a zinc-containing stereospecific methionine sulfoxide reductase. Proc Natl Acad Sci USA. 2002;99:4245-50.
32. Novoselov SV, Hua D, Lobanov AV, Gladyshev VN. Identification and characterization of Fep15, a new selenocysteine-containing member of the Sep15 protein family. Biochem J. 2006;394:575-79.
33. Labunskyy VM, Ferguson AD, Fomenko DE, Chelliah Y, Hatfield DL, Gladyshev VN. A novel cysteine-rich domain of Sep15 mediates the interaction with UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase. J Biol Chem. 2005;280(45):37839-45.
34. Verma S, Hoffmann FW, Kumar M, Huang Z, Roe K, Nguyen-Wu E et al. Selenoprotein K knockout mice exhibit deficient calcium flux in immune cells and impaired immune responses. J Immunol. 2011;186(4):2127-37.
35. Méplan C, Hesketh J. Functional aspects of the genomics of selenoproteins and selenocysteine incorporation machinery. In: Hatfield DL, Berry MJ, Gladyshev VN (eds.). Selenium: its molecular biology and role in human health. 3.ed. New York: Springer Science; 2012.
36. Mathers JC, Méplan C, Hesketh JE. Polymorphisms affecting trace element bioavailability. Int J Vitam Nutr Res. 2010;80(4-5):314-18.
37. Allamand V, Richard P, Lescure A, Ledeuil C, Desjardin D, Petit N et al. A single homozygous point mutation in a 3'untranslated region motif of selenoprotein N mRNA causes SEPN1-related myopathy. EMBO Rep. 2006;7(4):450-54.
38. Dumitrescu AM1, Liao XH, Abdullah MS, Lado-Abeal J, Majed FA, Moeller LC et al. Mutations in SECISBP2 result in abnormal thyroid hormone metabolism. Nat Genet. 2005;37(11):1247-52.
39. Forsberg L, De Faire U, Marklund SL, Andersson PM, Stegmayr B, Morgenstern R. Phenotype determination of a common Pro-Leu polymorphism in human glutathione peroxidase 1. Blood Cells Mol Dis. 2000;26(5):423-26.
40. Forsberg L, De Faire U, Morgenstern R. Low yield of polymorphisms from EST blast searching: analysis of genes related to oxidative stress and verification of the P197L polymorphism in GPX1. Hum. Mutat. 1999;13:294-300.
41. Ravn-Haren G, Olsen A, Tjønneland A, Dragsted LO, Nexø BA, Wallin A et al. Associations between GPX1 Pro198Leu polymorphism, erythrocyte GPX activity, alcohol consumption and breast cancer risk in a prospective cohort study. Carcinogenesis. 2006;27(4):820-25.
42. Hu YJ, Diamond AM. Role of glutathione peroxidase 1 in breast cancer: loss of heterozygosity and allelic differences in the response to selenium. Cancer Res. 2003;63(12):3347-51.
43. Lei C, Niu X, Wei J, Zhu J, Zhu Y. Interaction of glutathione peroxidase-1 and selenium in endemic dilated cardiomyopathy. Clin Chim Acta. 2009;399:102-08.
44. Cominetti C, Bortoli MC, Abdalla DSP, Cozzolino SMF. Considerações sobre estresse oxidativo, selênio e nutrigenética. 2011a;36:131-53.
45. Jablonska E, Gromadzinska J, Reszka E, Wasowicz W, Sobala W, Szeszenia-Dabrowska N et al. Association between GPx1 Pro198Leu polymorphism, GPx1 activity and plasma selenium concentration in humans. Eur J Clin Nutr. 2009;48(6):383-86.
46. Cominetti C, Bortoli MC, Purgatto E, Ong TP, Moreno FS, Garrido AB Jr et al. Associations between glutathione peroxidase-1 Pro198Leu polymorphism, selenium status, and DNA damage levels in obese women after consumption of Brazil nuts. Nutrition. 2011;27(9):891-96.
47. Horst MA, Cominetti C. Genômica nutricional. In: Cozzolino SMF, Cominetti C. Bases bioquímicas e fisiológicas da nutrição: nas diferentes fases da vida, na saúde e na doença. Barueri: Manole; 2013.
48. Ye H, Li X, Wang L, Liao Q, Xu L, Huang Y et al. Genetic associations with coronary heart disease: meta-analyses of 12 candidate genetic variants. Gene. 2013;531(1):71-77.
49. Voetsch B, Jin RC, Bierl C, Benke KS, Kenet G, Simioni P et al. Promoter polymorphisms in the plasma glutathione peroxidase (GPx-3) gene: a novel risk factor for arterial ischemic stroke among young adults and children. Stroke. 2007;38(1):41-49.
50. Voetsch B, Jin RC, Bierl C, Deus-Silva L, Camargo EC, Annichino-Bizacchi JM et al. Role of promoter polymorphisms in the plasma glutathione peroxidase (GPx-3) gene as a risk factor for cerebral venous thrombosis. Stroke. 2008;39(2):303-07.
51. Hesketh J. Nutrigenomics and selenium: gene expression patterns, physiological targets, and genetics. Annu Rev Nutr. 2008;28:157-77.
52. Méplan C, Crosley LK, Nicol F, Horgan GW, Mathers JC, Arthur JR et al. Functional effects of a common single-nucleotide polymorphism (GPX4c718t) in the glutathione peroxidase 4 gene: interaction with sex. Am J Clin Nutr. 2008;87:1019-27.
53. Méplan C, Crosley LK, Nicol F, Beckett GJ, Howie AF, Hill KE et al. Genetic polymorphisms in the human selenoprotein P gene determine the response of selenoprotein markers to selenium supplementation in a gender-specific manner (the Selgen study). Faseb J. 2007;21:3063-74.
54. Verloop H, Dekkers OM, Peeters RP, Schoones JW, Smit JW. Genetics in endocrinology: genetic variation in deiodinases: a systematic review of potential clinical effects in humans. Eur J Endocrinol. 2014;171(3):R123-35.
55. Curran JE, Jowett JB, Elliott KS, Gao Y, Gluschenko K, Wang J et al. Genetic variation in selenoprotein S influences inflammatory response. Nat Genet. 2005;37(11):1234-41.
56. Méplan C, Hughes DJ, Pardini B, Naccarati A, Soucek P, Vodickova L et al. Genetic variants in selenoprotein genes increase risk of colorectal cancer. Carcinogenesis. 2010;31(6):1074-79.
57. Sutherland A, Kim DH, Relton C, Ahn YO, Hesketh J. Polymorphisms in the selenoprotein S and 15-kDa selenoprotein genes are associated with altered susceptibility to colorectal cancer. Genes Nutr. 2010;5(3):215-23.
58. Brigélius-Flohé R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. Free Rad Biol Med. 1999;27(9/10):951-65.
59. Schomburg L, Schweizer U. Hierarchical regulation of selenoprotein expression and sex-specific effects of selenium. Biochim Biophys Acta. 2009;1790:1453-62.
60. Schweizer U, Bräuer AU, Köhrle J, Nitsch R, Savaskan NE. Selenium and brain function: a poorly recognized liaison. Brain Res Rev. 2004;45:164-78.

61. Steinbrenner H, Sies H. Selenium homeostasis and antioxidant selenoproteins in brain: implications for disorders in the central nervous system. Arch Biochem Biophys. 2013;536:152-57.
62. Benton D. Selenium intake, mood and other aspects of psychological functioning. Nutr Neurosci. 2002;5(6):363-74.
63. Howard MT, Carlson BA, Anderson CB, Hatfield DL. Translational redefinition of UGA codons is regulated by selenium availability. J Biol Chem. 2013;288(27):19401-13.
64. Yan J, Zheng Y, Min Z, Ning Q, Lu S. Selenium effect on selenoprotein transcriptome in chondrocytes. Biometals. 2013; 26:285-96.
65. Pagmantidis V, Méplan C, van Schothorst EM, Keijer J, Hesketh JE. Supplementation of healthy volunteers with nutritionally relevant amounts of selenium increases the expression of lymphocyte protein biosynthesis genes. Am J Clin Nutr. 2008; 87:181-89.
66. Pagmantidis V, Bermano G, Villette S, Broom I, Arthur J, Hesketh J. Effects of Se-depletion on glutathione peroxidase and selenoprotein W gene expression in the colon. FEBS Lett. 2005;579(3):792-96.
67. Kipp AP, Banning A, van Schothorst EM, Méplan C, Coort SL, Evelo CT et al. Marginal selenium deficiency down-regulates inflammation-related genes in splenic leukocytes of the mouse. J Nut Bioch. 2012;23:1170-77.
68. Cardoso BR, Busse AL, Hare DJ, Cominetti C, Horst MA, McColl G, Magaldi RM, Jacob-Filho W, Cozzolino SM. Pro198Leu polymorphism affects the selenium status and GPx activity in response to Brazil nut intake. Food Funct. 2016;7(2):825-33.
69. van Ommen B, El-Sohemy A, Hesketh J, Kaput J, Fenech M, Evelo CT et al. The Micronutrient Genomics Project: a community-driven knowledge base for micronutrient research. Genes Nutr. 2010;5(4):285-96.
70. Reszka E, Wieczoreka E, Jablonska E, Janasik B, Fendler W, Wasowicz W. Association between plasma selenium level and NRF2 target genes expression in humans. J Trace Elem Med Biol. 2014;pii: S0946-672X(14)00250-8.
71. Smith AD, Cheung L, Beshah E, Shea-Donohue T, Urban JF Jr. Selenium status alters the immune response and expulsion of adult heligmosomoides bakeri worms in mice. Infec Immun. 2013; 81(7):2546-53.
72. Hugejiletu H, Bobe G, Vorachek WR, Gorman ME, Mosher WD, Pirelli GJ et al. Selenium supplementation alters gene expression profiles associated with innate immunity in whole-blood neutrophils of sheep. Biol Trace Elem Res. 2013;154:28-44.
73. Méplan C, Hesketh J. Selenium and cancer: a story that should not be forgotten – insights from genomics. In: Zappia V, Panico S, Russo GL, Budillon A, Ragione FD. Advances in nutrition and cancer. Berlim: Springer; 2014.
74. Barger JL, Kayo T, Pugh TD, Vann JA, Power R, Dawson K et al. Gene expression profiling reveals differential effects of sodium selenite, selenomethionine, and yeast-derived selenium in the mouse. Genes Nutr. 2012;7:155-65.

Ferro | 16

Eduardo De Carli
Pryscila Dryelle Sousa Teixeira
Célia Colli

INTRODUÇÃO

O ferro é o quarto elemento mais abundante na crosta terrestre (em ordem de abundância: O > Si > Al > Fe) e é necessário para reações bioquímicas indispensáveis à vida de todos os seres vivos. A propriedade de doar e receber elétrons facilmente permite sua atuação em grande número de reações de oxirredução. Assim, dependem do ferro a obtenção de energia celular, por meio de reações do ciclo de Krebs e da fosforilação oxidativa mitocondrial, bem como as reações de ligação e de transporte de oxigênio.[1]

A síntese e o reparo do ácido desoxirribonucleico (DNA) são processos que também dependem da adequação do *status* celular de ferro, uma vez que este é cofator enzimático das ribonucleotídeo redutases e das DNA polimerases. A deficiência de ferro no organismo é associada a danos cromossômicos que, em parte, decorrem da atividade subótima dessas enzimas.[2] Em contrapartida, mutagênese e desregulação do ciclo celular resultam de excesso de ferro livre, o que aumenta o estresse oxidativo, com produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio via reações de Fenton e Haber-Weiss (conversão de peróxido de hidrogênio aos radicais livres).[3]

Por outro lado, na deficiência do mineral, muitas peroxidases antioxidantes (como a catalase), que são dependentes de ferro, têm sua atividade diminuída. Assim, por exemplo, em pacientes com anemia por deficiência de ferro, observou-se aumento do estresse oxidativo, redução da capacidade antioxidante e instabilidade genômica.[4]

O conteúdo de ferro corporal deve ser mantido dentro de limites bem definidos, a fim de evitar condições associadas com a deficiência ou com a sobrecarga do mineral. As duas principais doenças relacionadas com a homeostase do mineral são a anemia por deficiência de ferro, que afeta mais de 2 bilhões de pessoas no mundo, e a hemocromatose hereditária, doença genética associada ao acúmulo clinicamente importante de ferro corporal.[5, 6] Se, por um lado, a principal causa da deficiência de ferro no mundo é, há anos, reconhecida como a inadequação da ingestão alimentar do mineral,[5] por outro lado, as bases moleculares da sobrecarga de ferro estão sendo esclarecidas recentemente.[6] Um dos maiores avanços nesse sentido foi a descoberta da hepcidina, principal hormônio regulador da homeostase do ferro em mamíferos.[7]

Neste capítulo, será abordada a modulação da expressão gênica pelo ferro. Desequilíbrios na homeostase desse mineral têm sido associados a várias doenças crônicas multifatoriais (doenças neurodegenerativas, cardiovasculares, câncer, entre outras).[8-12] O entendimento das bases moleculares do seu metabolismo pode contribuir para a identificação dos determinantes das diferenças interindividuais em relação à resposta ao ferro da alimentação, bem como para o risco de desenvolvimento de diversos tipos de doenças que incluem, mas não de forma exclusiva, a anemia e a hemocromatose hereditária.

ASPECTOS BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS

Em geral, a homeostase dos minerais é regulada pela excreção urinária e fecal. Entretanto, o ferro é o único oligoelemento cujos excessos não são removidos pelo organismo. Por esse motivo, mecanismos regulatórios da homeostase desse mineral são centrados na absorção intestinal.[13]

Em condições normais, ocorre maior eficiência de absorção à medida que o ferro corporal é depletado e/ou as necessidades para a eritropoese são aumentadas, como acontece, por exemplo, durante o crescimento corporal e

a gestação ou após perdas de grandes volumes de sangue. Por outro lado, em resposta à expansão das reservas corporais de ferro, espera-se redução da absorção do conteúdo proveniente da alimentação. Com essa estratégia, o organismo garante o suprimento do mineral enquanto se protege dos seus excessos, altamente tóxicos e que provocam dano oxidativo em células e órgãos.[14]

Absorção intestinal e utilização de ferro

O ferro na alimentação está presente como ferro heme (encontrado exclusivamente em tecidos animais) e não heme (predominantemente presente em alimentos de origem vegetal), formas que são absorvidas por mecanismos independentes no duodeno e na parte superior do jejuno.[15]

O heme é removido da hemoglobina e da mioglobina no lúmen intestinal e é captado intacto pelos enterócitos por transporte ativo, ligado a seu transportador, a proteína carreadora de heme (HCP-1, *heme carrier protein*). Em seguida, o ferro é liberado no ambiente intracelular pela ação da enzima heme oxigenase 1 (Hox1).[16]

O ferro não heme é predominante na alimentação como Fe^{3+}, pouco biodisponível, uma vez que hidróxidos de Fe^{3+} têm menor solubilidade e precipitam com o aumento do pH que ocorre no duodeno durante o processo digestivo. Assim, o Fe^{3+} precisa ser reduzido a Fe^{2+} para ser internalizado pelos enterócitos duodenais. A proteína responsável pela internalização do ferro nessas células é o transportador de metal divalente (DMT-1, *divalent metal transporter 1*), ao passo que o citocromo b duodenal (DcytB, *duodenal cytochrome B*) foi identificado como redutase férrica intestinal.[17] Aliado a esse fato, o DcytB apresenta um local de ligação ao ácido ascórbico, o qual é um potencial doador de elétrons na redução do Fe^{3+} a Fe^{2+}.

O ferro não heme da alimentação também pode ter sua biodisponibilidade aumentada pela ação de agentes redutores, como o ácido ascórbico e peptídeos contendo resíduos de cisteína e histidina (produtos de digestão de carnes). O pH relativamente baixo do lúmen duodenal, juntamente com o microambiente ácido da superfície apical dos enterócitos, estabiliza o Fe como Fe^{2+} e promove a internalização deste no enterócito via DMT-1. Em contrapartida, componentes alimentares, como o ácido fítico (cujas principais fontes são cereais, raízes e tubérculos) e polifenóis (encontrados principalmente no café e chá), promovem a produção de complexos insolúveis de ferro, o que reduz sua biodisponibilidade.[15]

O ferro não heme, juntamente com o liberado do heme, compõe um único *pool* nos enterócitos, onde o ferro pode ser armazenado como ferritina ou ser exportado para o plasma, via canal designado ferroportina (Fpn) – também conhecida como *iron regulated transporter 1* (IREG1), *metal transporter protein 1* (MTP1) ou *solute-linked carrier family 40 (iron-regulated transporter) member 1* (SLC40A1). Essa proteína é a única, até o momento, identificada como responsável pelo efluxo celular de ferro. Humanos e camundongos carreadores de mutações que promovem a perda de função desse gene apresentam acúmulo de ferro no baço e no fígado, porém concentrações reduzidas do mineral no soro, o que evidencia a função da Fpn.[18]

Ao deixar a célula, o Fe^{2+} é reoxidado (Fe^{3+}) pela hefaestina, uma ferroxidase cobre-dependente que é expressa na membrana basolateral dos enterócitos. A hefaestina interage com a Fpn, promovendo a oxidação do ferro, possibilitando, assim, sua ligação à transferrina (Tf), a proteína transportadora do mineral no plasma[19] (Figura 16.1).

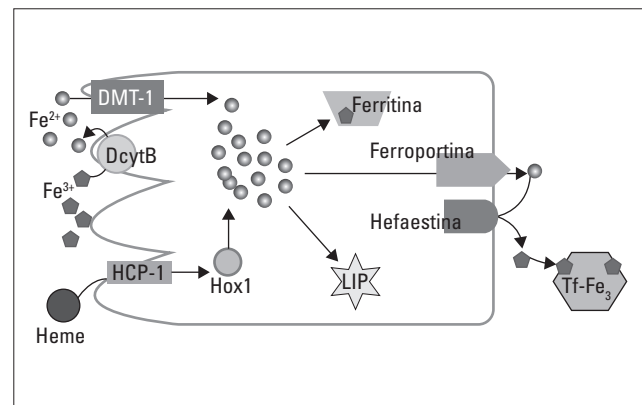



Figura 16.1 Captação do ferro alimentar por enterócitos duodenais. DcytB: citocromo b duodenal; DMT-1: transportador de metal divalente 1; HCP-1: proteína carreadora do Heme; Hox1: heme-oxigenase 1; LIP: *pool* de ferro lábil (do inglês, *Labile Iron Pool*); Tf: transferrina. **Fonte:** adaptada de Cheng et al.[20]

A Tf é membro de uma superfamília de proteínas ligantes de ferro, que inclui a lactoferrina (encontrada no leite e outros fluidos secretórios), a ovotransferrina (presente na clara de ovos) e a melanotransferrina. A função primária dessa proteína, produzida primariamente no fígado, é transportar o ferro até os sítios de utilização e armazenamento. Aproximadamente 3 a 4 mg de ferro estão ligados à Tf circulante. Sua concentração no plasma é da ordem de 30 μM e, em indivíduos com reservas de ferro normais, encontra-se entre 30 a 35% saturada. A ligação do ferro à Tf é reversível e dependente do pH, havendo completa associação em pH > 7,0.[20]

Todo o ferro que excede as necessidades fisiológicas é armazenado como ferritina, sobretudo em hepatócitos e células de Kupffer do fígado, mas também em macrófagos do baço e da medula óssea. Essas reservas variam de 120 a 1.000 mg em adultos, no entanto, representam quantida-

des relativamente pequenas do conteúdo total de ferro corporal. Aproximadamente 2,5 g de ferro (cerca de 65% do total de ferro corporal) estão contidos nas moléculas de hemoglobina, presentes nas células eritroides em maturação e nos eritrócitos circulantes.[13]

Diariamente, ocorrem pequenas perdas de ferro por descamação das células epiteliais, por perda de cabelo e pelo suor (~1 mg). Na mulher adulta saudável, a cada ciclo menstrual, aproximadamente 40 mg de ferro são eliminados com a menstruação, o que perfaz um adicional de perda diária de 1,5 mg de ferro em relação aos homens. Assim, em média, de 1 a 2,5 mg de ferro precisam ser absorvidos da alimentação para garantir o equilíbrio de ferro corporal.[13]

O ferro absorvido na alimentação não é suficiente para suprir a demanda estimada de 20 a 25 mg/dia para a eritropoese, o que faz com que seja necessária a reciclagem fisiológica do mineral. No baço e no fígado, principalmente, macrófagos do sistema reticuloendotelial fagocitam eritrócitos senescentes e promovem a degradação de moléculas de hemoglobina, o que possibilita a reutilização do ferro presente no heme. Assim como ocorre nos enterócitos, a retirada do ferro da molécula de heme é catalisada pela enzima Hox1.[14]

O ferro derivado dessa reciclagem pode ser armazenado nos macrófagos como ferritina ou ser exportado para o plasma, também como ocorre nos enterócitos, via Fpn. Nesse caso, a oxidação do Fe^{+2} a Fe^{+3}, necessária para sua ligação à Tf, é feita pela ceruloplasmina (Cp), ferroxidase circulante, produzida principalmente pelo fígado e que, assim como a hefaestina, é uma proteína dependente de cobre.[21]

A inter-relação dos mecanismos de absorção intestinal, a reciclagem de eritrócitos senescentes e a mobilização das reservas contidas na ferritina são essenciais para a manutenção da homeostase do ferro. A quantidade de ferro transferida do interior dos enterócitos, dos macrófagos ou dos hepatócitos para a circulação é estritamente relacionada com a quantidade necessária do mineral para a eritropoese na medula óssea e para a utilização por outros tecidos. Quando as reservas de ferro encontram-se reduzidas ou quando existe aumento na eritropoese, a absorção do ferro da alimentação é mais eficiente. Por outro lado, quando as reservas corporais de ferro estão repletas, ocorre redução da sua absorção intestinal.[13] Cabe destacar que também ocorre redução da absorção intestinal de ferro durante processos infecciosos ou inflamatórios, o que configura uma possível tentativa do organismo de reduzir a disponibilidade de ferro a microrganismos invasores.[22]

O controle central da absorção e utilização do ferro é exercido pela hepcidina, hormônio peptídico produzido principalmente por hepatócitos e que apresenta ação sistêmica. Esse peptídeo interage com a ferroportina na membrana plasmática das células, promovendo sua internalização e subsequente degradação. Desse modo, a hepcidina promove redução da taxa de transferência do ferro contido no interior de enterócitos, de macrófagos e de hepatócitos para o plasma.[14]

A expressão da hepcidina é controlada predominantemente em nível transcricional e é positivamente responsiva à saturação da Tf sérica com ferro, à abundância das reservas hepáticas de ferro e à inflamação, mas negativamente regulada por hipóxia e atividade eritropoética[7] (Figura 16.2). Assim, em condições normais, as concentrações circulantes de hepcidina são inversamente relacionadas com as reservas de ferro (ferritina) e com o ferro sérico.[23]

Flebotomia, hemólise e altas concentrações de eritropoetina – principais estimuladores da reticulocitose (sinal hematológico da produção acelerada de eritrócitos) – inibem a produção de hepcidina por mecanismos ainda não totalmente esclarecidos.[24] Por outro lado, concentração inadequadamente alta de hepcidina na circulação, acompanhada de baixas concentrações de ferro sérico, é, muitas vezes, descrita em modelos animais e em pacientes com câncer ou outras doenças infecciosas e inflamatórias. Esse fato deve-se, em grande parte, à expressão aumentada da hepcidina em resposta à ação de citocinas com ação pró-inflamatória no fígado, o que reduz a disponibilidade de ferro na circulação e promove o aprisionamento das reservas teciduais do mineral.[22]

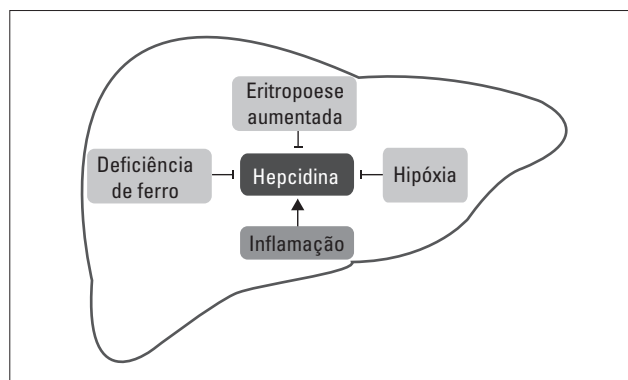



Figura 16.2 Sinais fisiológicos que afetam a expressão hepática de hepcidina. **Fonte:** adaptada de Ganz e Nemeth.[25]

MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA PELO FERRO

A expressão dos genes reguladores da homeostase do ferro pode ser diretamente modulada pelo conteúdo intracelular do mineral. Muitos são os mecanismos pelos quais o ferro modifica a expressão de genes alvo e estes parecem ser comuns aos diferentes tipos celulares envol-

vidos no seu metabolismo. Em nível sistêmico, a manutenção da homeostase do ferro é dependente do funcionamento adequado das proteínas que regulam a produção hepática de hepcidina.[13]

Adiante será discutido como o *status* de ferro atua sobre a regulação de sua absorção no intestino e como modula a produção hepática de hepcidina. Sempre que relevantes, serão abordados aspectos específicos da modulação da expressão gênica pelo ferro em eritrócitos e macrófagos.

Ação do ferro sobre a expressão gênica nos enterócitos

As células do organismo são capazes de captar o ferro da circulação (ligado à Tf) via receptor de transferrina 1 (TfR1), o qual é expresso na membrana plasmática. Após a interação da Tf saturada de ferro com o seu receptor, ocorre endocitose do complexo Tf-TfR1 e o ferro é liberado no interior das células. Todo o conteúdo de ferro que não é prontamente utilizado é armazenado como ferritina, proteína capsular que armazena o mineral em um estado inerte.[14] Sempre que necessário, há degradação de ferritina nos lisossomos e reações de redução do Fe^{3+}, disponibilizando-o para reações citosólicas ou intraorganelares. Em condições de excesso de ferro, a ferritina celular pode ser convertida em hemossiderina, partícula insolúvel, considerada produto de degradação da ferritina, claramente identificada por microscopia em células do fígado, baço e medula óssea.[26]

Células repletas de ferro, principalmente macrófagos, secretam pequenas quantidades de ferritina no soro. Os mecanismos de degradação intracelular dessa molécula e sua via de secreção ainda não foram totalmente esclarecidos.[19] Em indivíduos saudáveis, há forte correlação entre valores de ferritina sérica e as reservas corporais de ferro: para cada 1 mcg/L de ferritina sérica, estima-se que exista o equivalente a 8 a 10 mg de ferro em reservas no fígado, baço e medula óssea.[27]

A expressão do TfR1 e da ferritina é diretamente modulada pela concentração intracelular de ferro e ocorre por mecanismos pós-transcricionais. Esses mecanismos envolvem a interação de proteínas citosólicas reguladoras do ferro (IRP 1 e 2, *iron regulatory proteins*) com elementos de resposta ao ferro (IRE, *iron responsive elements*) presentes nas regiões não traduzidas (UTR, *untranslated region*) 5' ou 3' de alguns RNAm. O sistema IRP/IRE é o principal regulador da expressão de genes que codificam proteínas responsáveis pela homeostase celular de ferro, e também está envolvido na modulação de outros genes com funções diversas, dentre os quais aqueles envolvidos no metabolismo do citrato, na proliferação celular, na manutenção da estrutura do citoesqueleto, no ciclo celular e na resposta adaptativa à hipóxia.[28, 29]

Proteínas reguladoras do ferro (IRP)

Dois tipos de IRP citosólicas, IRP-1 e IRP-2, são conhecidos. Quando as concentrações de ferro intracelular diminuem, ambas podem se ligar a um ou mais IRE presentes na sequência de alguns RNAm. Muitos dos RNAm que contêm IRE são transcritos de genes que codificam proteínas essenciais ao equilíbrio celular de ferro. Estas incluem proteínas envolvidas na internalização (TfR1 e DMT1), no armazenamento (ferritina), na utilização (succinato desidrogenase, aconitase mitocondrial, delta-aminolevulinato sintase [delta-ALAS-2]) e no efluxo celular de ferro (Fpn). Quando as concentrações de ferro celular estão altas, por outro lado, a ligação de IRP aos RNAm é rapidamente inativada por modificação pós-traducional da IRP-1 ou por degradação da IRP-2.[28]

A IRP-1 é estruturalmente semelhante à aconitase mitocondrial, que converte citrato a isocitrato no ciclo de Krebs. Quando há deficiência de ferro, essa proteína se liga fortemente às sequências de IRE, mas quando o conteúdo de ferro intracelular é adequado, atua como aconitase citoplasmática. Essa dupla função é controlada pela presença ou ausência de ligação ferro-enxofre (Fe-S) no sítio de ligação dessa proteína com o IRE. Quando as concentrações celulares de ferro estão altas, uma ligação 4Fe-4S é inserida no sítio de ligação ao IRE e a IRP-1 assume uma conformação que impossibilita sua ligação aos RNAm (Figura 16.3). O ferro da quarta posição da ligação Fe-S é altamente lábil e prontamente removido quando as concentrações celulares do mineral diminuem, o que leva à desestruturação desse complexo, permitindo a ligação IRP-1/IRE.[30]

A IRP-2 é menos abundante que a IRP-1. Seu conteúdo nas células é controlado por síntese *de novo*, iniciada quando as concentrações de ferro do meio estão baixas. Por outro lado, essa proteína sofre degradação proteassomal em células com altas concentrações do mineral. A IRP-2 não contém sítio de ligação para o complexo Fe-S, logo, sua atividade de ligação ao IRE é dose-dependente. Cérebro e intestino são os tecidos em que a IRP-2 tem contribuição especialmente importante para o sistema IRP/IRE.[31]

Elementos de resposta ao ferro (IRE)

Os IRE são elementos regulatórios presentes em regiões não traduzidas 5' ou 3' de RNAm, representados por uma extremidade apical de 6 nucleotídeos em forma de curva e duas estruturas em forma de haste, separados por uma protuberância assimétrica contendo uma citosina desemparelhada. Um IRE foi identificado na região não traduzida 5' do RNAm da ferritina e, posteriormente,

cinco sequências similares foram identificadas na região UTR 3' do RNAm do TfR1. Quando o IRE está situado na região UTR 5', como no caso do RNAm da ferritina, a ligação da IRP resulta na supressão da interação do transcrito com o ribossomo e, assim, na consequente redução da tradução da proteína. Inversamente, a ligação da IRP ao IRE da região UTR 3' protege o transcrito da degradação endonucleolítica, levando à estabilização do RNAm, com consequente regulação positiva da expressão da proteína. Assim, quando as reservas de ferro celular estão repletas, o RNAm da ferritina é eficientemente traduzido, em concordância com a necessidade celular de armazenamento do ferro. Por outro lado, quando a concentração celular de ferro diminui, a concentração de ferritina também é menor, o que se deve à ligação das IRP ao IRE localizado na região UTR 5' do seu RNAm.[32]

O efeito do ferro sobre a expressão do TfR1 é inverso em relação à expressão de ferritina. Quando as reservas celulares de ferro estão repletas, os TfR1 estão em menor número; quando a concentração de ferro está baixa, a expressão de TfR1 é elevada, uma vez que ocorre a ligação das IRP às cinco sequências de IRE na região UTR 3' do RNAm do TfR1, o que estabiliza a molécula e aumenta a eficiência de sua tradução[31] (Figura 16.3).

Regulação da proteína DMT-1

A proteína DMT-1 – também conhecida como SLC11A2 (*solute-linked carrier family 11 [proton-coupled divalent metal ion transportes], member 2*) – está envolvida na absorção e no uso celular de ferro. Além do papel primário dessa proteína no transporte de Fe^{3+} através da membrana apical dos enterócitos, ela atua também na liberação intracelular do ferro captado pelo complexo Tf-TfR1 em todas as outras células[19]. O bloqueio desse transportador, em camundongos, confirmou sua essencialidade tanto para a absorção intestinal quanto para a maturação de precursores eritroides a eritrócitos maduros.[34]

A transcrição do gene *SLC11A2*, que codifica a proteína DMT-1 em mamíferos, origina quatro diferentes isoformas, as quais diferem quanto a sua distribuição nos tecidos e quanto aos mecanismos de regulação da sua expressão. Elas existem em razão do *splicing* alternativo no éxon 16 e à presença de dois sítios de início da transcrição (éxons 1A e 1B). O *splicing* alternativo no éxon 16 dá origem a duas variantes que diferem nos aminoácidos terminais 19-25 e em sua sequência 3' não traduzida. Apenas um desses transcritos contém IRE em sua sequência. Embora todas as isoformas de DMT-1 sejam

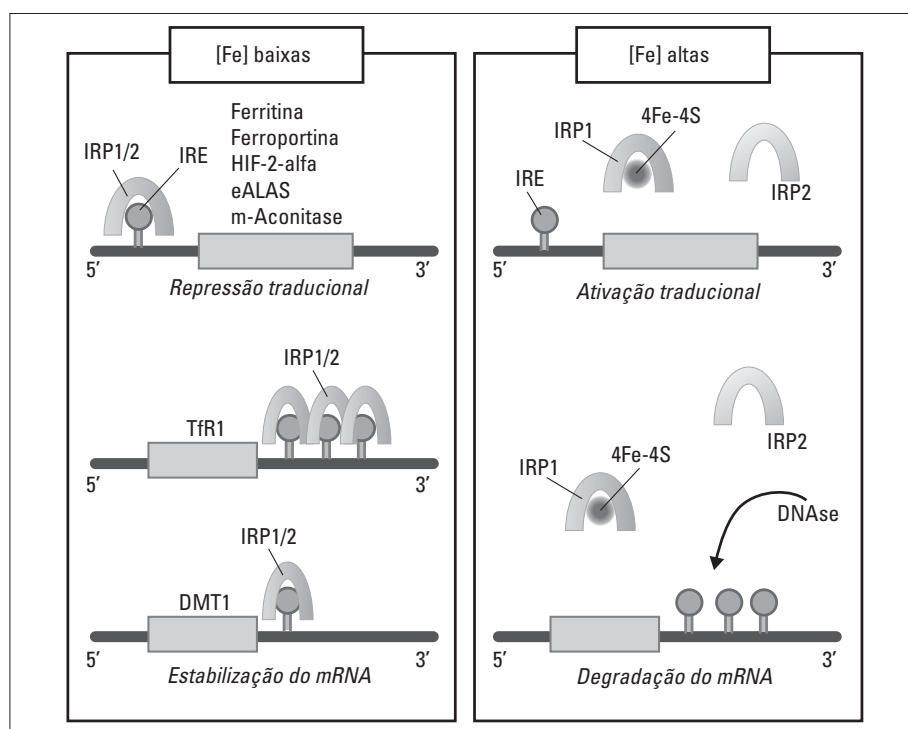



Figura 16.3 Sistema IRP/IRE de controle da expressão gênica. 4Fe-4S: ligação ferro-enxofre; DMT1: transportador de metal divalente; eALAS: delta-aminolevulinato sintase; HIF-2-alfa: fator de transcrição induzido por hipóxia 2-alfa; IRE: elemento de resposta ao ferro (do inglês, *Iron Responsive Element*); IRP1/2: proteína reguladora do ferro 1 ou 2 (do inglês, *Iron Responsive Protein*); m-Aconitase: aconitase mitocondrial; TfR1: receptor de transferrina 1. **Fonte:** adaptada de Wallander et al.[33]

encontradas nos enterócitos, a isoforma cujo RNAm contém IRE é sugerida como aquela mais importante para a atividade absortiva nessas células. Deste modo, no intestino, a expressão da DMT-1 é aumentada quando as reservas de ferro estão depletadas, em concordância com a presença de IRE na região 3' não traduzida do seu RNAm.[35, 36]

Além do efeito direto do ferro sobre a expressão da DMT-1, a abundância do RNAm dessa proteína nos enterócitos é aumentada em resposta à baixa pressão parcial de oxigênio, que ocorre, por exemplo, em estados de anemia. Nessas condições, ocorre a ativação de fatores de transcrição induzidos por hipóxia, particularmente o HIF2-alfa, que se liga a elementos de resposta presentes na região promotora do gene *SLC11A2*, favorecendo sua transcrição, com consequente aumento da absorção de ferro.[37]

Regulação da ferroportina

O efluxo de ferro em todos os tipos de células é mediado pela Fpn. A expressão dessa proteína é regulada em níveis transcricional (fatores de transcrição) e pós-transcricional (sistema IRP/IRE). Além disso, sua função de canal de ferro na membrana plasmática é controlada em nível pós-traducional pelo eixo hepcidina-Fpn,[38] conforme comentado anteriormente.

A transcrição do RNAm da Fpn parece ser induzida por íons de ferro e pela molécula de heme. Os mecanismos relacionados com esses eventos e os fatores de transcrição relevantes ainda não foram totalmente esclarecidos. A Bach1 (*Btb and Cnc Homology* 1), uma proteína sensível ao heme, pode, juntamente com o fator de transcrição eritroide 2 (Nrf2, *nuclear factor erythroid 2*), ser responsável pela ativação da expressão do RNAm da Fpn em macrófagos fagocitários de eritrócitos.[39]

As moléculas de heme derivadas da eritrofagocitose interagem com a Bach1, que é inibidora natural da ação do Nrf2 por permanecer ligada a sequências reguladoras de genes alvo desse fator de transcrição. A ligação do heme à proteína Bach1 promove seu deslocamento do núcleo, o que permite que o Nrf2, juntamente com outras proteínas acessórias, ative a transcrição do gene da Fpn e de uma série de outros genes cujos produtos proteicos têm ação de proteção celular ao estresse oxidativo (Hox1, ferritina, glutationa-S-transferase, NADPH-quinona oxirredutase 1, entre outras).[39]

Uma vez que íons de ferro livre facilitam a produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, a transcrição de Fpn induzida pelo Nrf2 pode, indiretamente, ser ativada pelo conteúdo intracelular do ferro não ligado à molécula de heme. Nesse caso, a ativação desse fator de transcrição é exercida pelo *status* redox do meio.[38]

Embora a abundância de RNAm da Fpn possa ser modificada pela atividade de modulação da sua transcrição, citada anteriormente, a tradução da proteína é ainda regulada pela atividade do sistema IRE/IRP. Similar aos transcritos da ferritina, uma estrutura IRE foi identificada na região 5' não traduzida do RNAm da Fpn. Assim, seria esperado que, quando as concentrações de ferro intracelular fossem baixas, houvesse redução da tradução da Fpn. Entretanto, uma baixa atividade de tradução do RNAm de Fpn foi observada em células duodenais de animais expostos a rações ricas em ferro e o contrário foi observado quando expostos a rações pobres no mineral.[40]

Essas observações suscitaram a identificação de um segundo transcrito de Fpn, denominado Fpn1B, cuja tradução não é sensível à concentração de ferro intracelular, pois não contém IRE em sua sequência. Análises de expressão gênica, posteriormente, indicaram que o RNAm da Fpn1B representa mais de 25% do total de transcritos de Fpn em células duodenais e uma porcentagem ainda maior em eritroblastos humanos.[41]

Outros metais de transição, a hipóxia e a inflamação podem influenciar a expressão de Fpn. A inflamação induzida por injeção de lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos resultou em decréscimo da transcrição de Fpn no baço e no intestino de ratos e camundongos; entretanto, nenhuma citocina inflamatória específica foi associada ao evento.[38] Já em condições de hipóxia, a transcrição de Fpn é aumentada, assim como ocorre com a expressão da DMT-1, também em função da presença de elementos de resposta ao HIF2-alfa na região promotora do gene.[38] Na sequência desse promotor também foram identificados elementos de resposta ao fator de transcrição MTF-1 (*metal transcription factor 1*), que funciona como indutor da expressão do gene em resposta às concentrações intracelulares aumentadas de zinco (Zn) e cádmio (Cd).[41]

Regulação do citocromo b duodenal e da hefaestina

No intestino, um transporte transepitelial eficiente de ferro depende de duas importantes reações redox:[15]

- Redução do Fe^{3} a Fe^{2+} para internalização no enterócito via DMT-1.
- Oxidação do Fe^{2+} para a saída do mineral da célula pela membrana basolateral, via Fpn, permitindo sua captação pela Tf.

Enquanto a última reação é dependente da hefaestina, a primeira é catalisada pelo DcytB, membro da família de citocromos b_{561}. Essa enzima contém heme em sua estrutura e requer ascorbato para exercer sua atividade redutora[42] (ver Figura 16.1).

A expressão do DcytB é fortemente regulada tanto pelo consumo alimentar de ferro como pelo *status* corporal do mineral, e também pela hipóxia. Grande parte dos estudos que avaliaram a regulação da expressão gênica do DcytB utilizou modelo de células imortalizadas tipo Caco-2 ou MDCK para demonstrar o aumento da internalização de ferro nas células que superexpressam DcytB. Em contrapartida, o bloqueio do gene *Cybrd1,* que codifica a DcytB em camundongos, não promoveu deficiência de ferro, indicando assim que sua ação não é indispensável para a absorção do ferro nesses animais.[42]

A hefaestina é dependente de cobre e homóloga à ceruloplasmina. Estudos com camundongos *sla* (*sex-linked anemia*) que apresentam mutação de perda de função do gene da hefaestina (*Hephe*) desenvolvem anemia grave. Seu papel importante na absorção do ferro alimentar foi também confirmado em modelo resultante do cruzamento de camundongos com hemocromatose hereditária (mutação no gene *hfe*) e camundongos *sla*. Esses animais com dupla mutação, apesar de apresentarem baixas concentrações circulantes de hepcidina e, assim, serem predispostos a maior absorção de ferro, apresentam limitação na liberação do ferro do intestino para a circulação e, consequentemente, acumulam menos ferro no fígado.[43]

Ainda que a hefaestina seja importante para a absorção de ferro, não se sabe se sua expressão é diretamente regulada pelo mineral. A expressão da hefaestina é maior no intestino que em outros tecidos, porém não é limitada ao duodeno e ocorre ao longo de todo o trato gastrintestinal, o que sugere que essa proteína tenha outra função além de regular a absorção de ferro. Em modelos com roedores, observou-se que alterações da concentração de ferro na ração (grupo com restrição de aproximadamente 90% das recomendações e outro com sobrecarga do mineral – suplementação com 2% de ferrocarbonila por seis meses) não alteraram a expressão de hefaestina, ao passo que, em pacientes com deficiência de ferro, essa expressão foi aumentada.[43, 44]

Tanto o transcrito da DcytB quanto o da hefaestina não contêm IRE em sua sequência não traduzida, o que sugere que um possível controle da transcrição desses genes pelo próprio ferro aconteceria em nível transcricional. A expressão proteica e a atividade da hefaestina são reduzidas na deficiência de cobre e, além do prejuízo na síntese, na meia-vida e na atividade da ceruloplasmina nessa condição, a deficiência secundária de ferro ocorre frequentemente.[21] Em situações de hipóxia, há aumento da abundância do RNAm do DcytB nas células intestinais, já que na região promotora desse gene existe um elemento de resposta ao fator de transcrição HIF2-alfa.[45]

Ação do ferro sobre a expressão hepática de hepcidina

Como já mencionado, a hepcidina é o principal regulador da homeostase de ferro por controlar sua passagem do interior de enterócitos, hepatócitos e macrófagos para o plasma. Após a hepcidina se ligar à Fpn na membrana plasmática, esta última é fosforilada, internalizada, ubiquitinada e degradada pelos lisossomos.[7]

A produção da hepcidina ocorre principalmente nos hepatócitos e sua forma bioativa é um peptídeo de 25 aminoácidos (derivado de precursor com 84 aminoácidos) que é codificado pelo gene *HAMP*, o qual tem sua sequência conservada entre as espécies de vertebrados. A deleção do gene *HAMP* em camundongos ou a presença de mutações que acarretam perda de sua função em humanos ocasiona formas graves de sobrecarga de ferro.[46] Em contrapartida, o aumento da expressão causa a diminuição da absorção de ferro.[22]

A função de remover a Fpn da superfície celular faz que a hepcidina dificulte a saída do ferro das células (enterócitos, macrófagos e hepatócitos), provocando aumento da concentração intracelular do mineral, que é estocado como ferritina. Quando há aumento das concentrações intracelulares de ferro no intestino, ocorre regulação negativa da expressão da DMT-1 e a absorção do ferro alimentar reduz ainda mais.[15]

Em condições de eritropoese normal, o aumento da expressão da hepcidina em resposta ao *status* de ferro ocorre pela ativação da via de sinalização das proteínas morfogenéticas ósseas (BMP, *bone morphogenetic proteins*). A transcrição do gene *HAMP* por essa via ocorre pela transdução de sinais mediados por proteínas da família SMAD (*son of mothers against decapentaplegic homologs*), que se ligam a elementos de resposta na região promotora do gene.[14,19]

Receptores de BMP (BMPR) estão presentes na membrana plasmática dos hepatócitos e formam complexos com um correceptor conhecido como hemojuvelina (HJV). Em estudos de padrão de expressão de BMP, observou-se que a abundância de RNAm da BMP6 no fígado está fortemente correlacionada com a concentração de ferro nesse órgão. Posteriormente, estudos com camundongos *knockout* e ensaios de administração *in vivo* de diferentes BMP confirmaram que a BMP6 é a principal ligante ativadora do completo BMPR-HJV, ainda que, em menor grau, as BMP2 e BMP4 possam também mediar o aumento da expressão de hepcidina em resposta às reservas hepáticas de ferro.[47] Após a ligação da BMP6 ao complexo BMPR-HJV ocorre a fosforilação e a ativação das proteínas intracelulares SMAD 1, 5 e 8, que se ligam ao mediador comum SMAD 4 e, por fim, agem

como fator de transcrição para o aumento da expressão gênica da hepcidina no núcleo dos hepatócitos.[19]

Acredita-se que a ativação da via de sinalização BMP-SMAD é também responsável pelo aumento da expressão de hepcidina em resposta às concentrações circulantes de ferro. Isso ocorre por intermédio do receptor de transferrina 2 (TfR2), que, juntamente com a proteína HFE e o TfR1, é um importante sensor e regulador das concentrações séricas de ferro. A função biológica do TfR2 está relacionada à sua capacidade de interagir com a Tf saturada com ferro. Supostamente, em situações de aumento das concentrações séricas de ferro, o TfR1, acoplado à proteína HFE na membrana plasmática das células, excede sua capacidade de ligação à Tf, dando espaço à ligação dessa molécula com o TfR2. A ligação Tf-TfR2 é estabilizada pela HFE, que é deslocada do TfR1 e, subsequentemente, o complexo HFE-TfR2 interage com o complexo BMPR-HJV, ativando-o, o que desencadeia a fosforilação intracelular das SMA[19] (Figura 16.4).

HEMOCROMATOSE

Mutações em genes que codificam as proteínas envolvidas na via de sinalização BMP-SMAD são causa de diferentes formas de hemocromatose hereditária (HH). Essa doença resulta da produção inadequadamente baixa de hepcidina e do consequente acúmulo de ferro em muitos tecidos (aumento da saturação da transferrina e ferritina séricas), especialmente no fígado, o que pode promover danos celulares e teciduais (p. ex., cirrose e fibrose hepática).[6]

A expressividade clínica da HH é distinta entre os tipos da doença. A mais comum, a do tipo 1, é decorrente de prejuízo na função do gene *HFE*. Casos mais raros são decorrentes de mutações nos genes *HAMP* e *HJV* – HH tipo 2 ou no gene *TfR2* – HH tipo 3. A maioria dos pacientes com HH tipos 2 e 3 desenvolvem sintomas clínicos da doença entre a segunda e a quarta décadas de vida. Já aqueles com HH tipo 1 têm curso clínico menos grave e, em geral, manifestam sobrecarga de ferro clinicamente importante entre a quinta e a sexta décadas de vida.[6]

Indivíduos de descendência europeia são aqueles com maior risco para HH tipo 1. No norte europeu, 85 a 90% dos casos desse tipo da doença são decorrentes da herança autossômica recessiva da mutação HFE^{282Y}, responsável por substituição de uma cisteína por uma tirosina no aminoácido 282 da proteína.[6] Essa troca de aminoácidos afeta o funcionamento adequado da proteína HFE na membrana plasmática dos hepatócitos.[48]

A proteína HFE é membro da família de proteínas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC, *major histocompatibility complex*) da classe I. Além de muito expressa nos hepatócitos, está presente também em células do duodeno, em macrófagos e em monócitos circulantes. Fisiologicamente, a HFE se associa à 2-microglobulina para que possa ser apropriadamente ancorada na superfície celular. A mutação HFE^{282Y} está associada com prejuízo de ligação HFE-β2-microglobulina.[48]

Como ilustrado na Figura 16.4, a HFE também tem a capacidade de se ligar aos dois tipos de receptor de Tf e participa, desse modo, da ativação da via BMP-SMAD em resposta ao *status* de ferro. Quando há deficiência de ferro e, consequentemente, há pouco ferro ligado à Tf, a HFE liga-se ao TfR1. Já em situação de alta saturação da Tf, a HFE se liga ao TfR2, induzindo a expressão de hepcidina.[19]

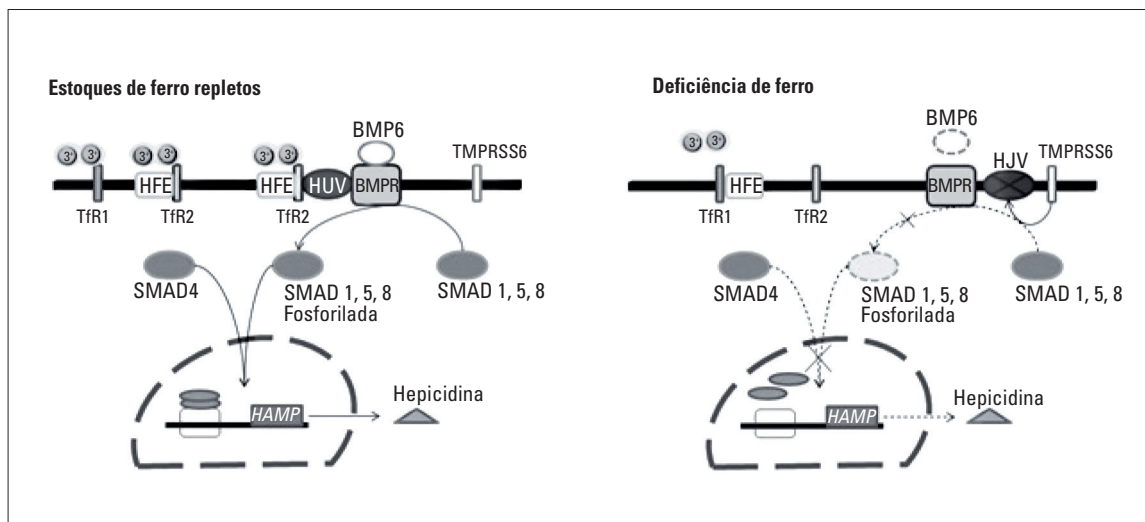



Figura 16.4 Via de sinalização BMP-SMAD e expressão de hepcidina em hepatócitos. BMP: proteínas morfogenéticas ósseas (do inglês, *Bone Morphogenetic Protein*); BMPR: receptor de BMP; *HAMP*: gene que codifica a hepcidina; HJV: hemojuvelina; SMAD: fatores de transcrição da família SMAD (do inglês, *16 Son of Mothers Against Decapentaplegic Honolog*); TfR1: receptor de transferrina 1; TfR2: receptor de transferrina 2; TMPRSS6: matriptase-2 – protease em serina transmembranal 6 – matriptase 2. **Fonte:** adaptada de Estatiév e Gasche.[19]

Na deficiência de ferro e na hipóxia, por outro lado, há aumento da produção hepática da protease transmembrana em serina TMPRSS6, que atua como antagonista da rota de sinalização celular das BMP (Figura 16.4). O produto gênico do TMPRSS6, a matriptase-2 (MTP-2), promove o processamento proteolítico da HJV na membrana plasmática dos hepatócitos, bloqueando o efeito das BMP sobre a produção da hepcidina. Em humanos, mutações que promovem a perda de função do gene *TMPRSS6* são associadas com casos raros de anemia por deficiência de ferro congênita, também conhecida como anemia ferropriva refratária ao ferro (Irida, *iron-refractory iron deficiency anemia*).[49]

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os mecanismos de controle da expressão gênica pelo ferro incluem o sistema IRP/IRE e outras vias de sinalização celular, em especial a via BMP-SMAD, relacionada com a produção de hepcidina. O papel desse hormônio em particular é tema de interesse crescente na atualidade, uma vez que essa proteína atua como regulador central tanto da absorção como da utilização das reservas de ferro.

A expansão do conhecimento das interações gene-ambiente e gene-gene pode levar a uma nova abordagem das doenças associadas aos desequilíbrios na homeostase de ferro que têm causas heterogênicas e diferentes quadros clínicos, dentre as quais a deficiência e a sobrecarga do mineral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kain W, Schwedederski B. Bioinorganic chemistry: inorganic elements in the chemistry of life. v.1. New York: John Wiley & Sons; 1994.
2. Zhang C. Essential functions of iron-requiring proteins in DNA replication, repair and cell cycle control. Protein Cell. 2014; 5(10):750-60.
3. Prá D, Franke SIR, Henriques JAP, Fenech M. Iron and genome stability: an update. Mutation Research. 2012;733:92-99.
4. Aslan M, Horoz M, Kocyigit A, Ozgonul S, Celik H, Celik M et al. Lymphocyte DNA damage and oxidative stress in patients with iron deficiency anemia. Mutat. Res. 2006;601:144-49.
5. Zimmermann MB, Hurrell RF. Nutritional iron deficiency. Lancet. 2007;370(9586):511-20.
6. Weiss G. Genetic mechanisms and modifying factors in hereditary hemochromatosis. Gastroenterology and Hepatology. 2010;7(1):50-58.
7. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. Science. 2004;306(5704):2090-93.
8. Marques O, Silva BM, Porto G, Lopes C. Iron homeostasis in breast câncer. Cancer Lett. 2014;347(1):1-14.
9. Wlazlo N, Van-Greevenbroek MM, Ferreira I, Jansen EH, Feskens EJ, Van Der Kallen CJ et al. Iron metabolism is prospectively associated with insulin resistance and glucose intolerance over a 7-year follow-up period: the CODAM study. Acta Diabetologica. 2015;52(2):337-48.
10. Romeu M, Aranda N, Giralt M, Ribot B, Nogues MR, Arija V. Diet, iron biomarkers and oxidative stress in a representative sample of Mediterranean population. Nutrition Journal. 2013;16(12).
11. Lee JY, Park JM, Hong JA, Lee DC, Im JA, Lee JW. Serum ferritin is differentially associated with anti-oxidative status and insulin resistance in healthy obese and non-obese women. Korean Journal of Family Medicine. 2012;33(4):205-10.
12. Broedbaek K, Siersma V, Andersen JT, Petersen M, Afzal S, Hjelvang B et al. The association between low-grade inflammation, iron status and nucleic acid oxidation in the elderly. Free Radical Research. 2011;45(4):409-16.
13. Ganz T. Hepcidin and iron regulation, 10 years later. Blood. 2011;117(17):4425-33.
14. Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. Cell. 2010; 142(1):24-38.
15. Sharp PA. Intestinal iron absorption : regulation by dietary & systemic factors. Int J Vitam Nutr Res. 2010;80(4/5):231-42.
16. Le Blanc S, Garrick MD, Arredondo M. Heme carrier protein 1 transports heme and is involved in heme-Fe metabolism. American Journal of Physiology. Cell Physiology. 2012;312(12):C1780-85.
17. Latunde-Dada (2008).
18. Domenico I, Vaughn MB, Yoon D, Kushner JP, Ward DM, Kaplan J. Zebrafish as a model for defining the functional impact of mammalian ferroportin mutations. Blood. 2007;110(10):3780-83.
19. Estatiév R, Gasche C. Iron sensing and signalling. Gut. 2011; 61(6):933-52.
20. Cheng Y, Zak O, Aisen P, Harrison SC, Walz, T. Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex. Cell. 2004;116(4):565-76.
21. Chen H, Attieh ZK, Dang T, Huang G, Van Der Hee RM, Vulpe C. Decreased hephaestin expression and activity leads to decreased iron efflux from differentiated Caco2 cells. Cell Biochem. 2009;107(4):803-08.
22. Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, Mativet S, Beaumont C, Grandchamp B et al. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. PNAS. 2002;99(7):4596-601.
23. Roe MA, Collings R, Dainty JR, Swinkels DW, Fairweather-Tait SJ. Plasma hepcidin concentrations significantly predict interindividual variation in iron absorption in healthy men. Am J Clin Nutr. 2009;89(4):1088-91.
24. Frazer DM, Wilkins SJ, Darshan D, Badrick AC, McLaren GD, Anderson GJ. Stimulated erythropoiesis with secondary iron loading leads to a decrease in hepcidin despite an increase in bone morphogenetic protein 6 expression. British Journal of Haematology. 2012;157(5):615-26.
25. Ganz T, Nemeth E. Hepcidin and iron homeostasis. Biochim Biophys Acta. 2012;1823(9):1434-43.
26. Domenico I, Ward DM, Kaplan J. Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders. Nature. 2008;9:72-81.
27. Cook JD, Finch CA. Assessing iron status of a population. Am J Clin Nutr. 1979;32:2115-19.
28. Pantopoulos K. Iron metabolism and the IRP/IRE regulatory system: an update. Ann N Y Acad Sci. 2004;1012:1-13.

29. Eisenstein RS, Blemings KP. Iron regulatory proteins, iron responsive elements and iron homeostasis. J. Nutr. 1998;128(12):2295-98.
30. Rouault TA, Stout CD, Kaptain S, Harfor JB, Klausner RD. Structural relationship between an iron-regulated RNA-binding protein (IRE-BP) and aconitase: functional implications. Cell. 1991;64:881-83.
31. Anderson CP, Shen M, Eisenstein RS, Leibold EA. Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins. Biochimica et Biophysica Acta. 2012;1823:1468-83.
32. Thomson AM, Rogers JT, Leedman PJ. Iron-regulatory proteins, iron-responsive elements and ferritin mRNA translation. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology. 1999;31:1139-52.
33. Wallander ML, Leibold EA, Eisenstein RS. Molecular control of vertebrate iron homeostasis by iron regulatory proteins. Biochimica et Biophysica Acta. 2006;1763(7):668-89.
34. Andolfo I, Falco LD, Asci R, Russo R, Colucci S, Gorrese M et al. Regulation of divalent metal transporter 1 (DMT1) non-IRE isoform by the microRNA Let-7d in erythroid cells. Haematologica. 2010;95(8):1244-52.
35. Lee PL, Gelbart T, West C, Halloran C, Beutler E. The human Nramp2 gene: characterization of the gene structure, alternative splicing, promoter region and polymorphisms. Blood Cells Mol Dis. 1998;24:199-215.
36. Hubert N, Hentze MW. Previously uncharacterized isoforms of divalent metal transporter (DMT)-1: implication for regulation and cellular function. Proc Natl Acad Sci USA. 2002;99:12345-450.
37. Shah YM, Matsubara T, Ito S, Yim SH, Gonzalez FJ. Intestinal hypoxia inducible transcription factors are essential for iron absorption following iron deficiency. Cell Metabolism. 2009;9(2):152-64.
38. Ward DM, Kaplan J. Ferroportin-mediated iron transport: Expression and regulation. Biochim Biophys Acta. 2012;1823(9): 1426-33.
39. Marro S, Chiabrando D, Messanan E, Stolte J, Turco E, Tolosano E. Heme controls ferroportin 1 (FPN1) transcription involving Bach1, Nrf2 an MARE/ARE sequence motif at position -7007 of the FPN1 promoter. Haematologica. 2010;95(8):1261-68.
40. Zhang DL, Hughes RM, Ollivierre-Wilson H, Ghosh MC, Rouault TA. A ferroportin transcript that lacks an iron-responsive element enable duodenal and erythroid precursor cell to evade translational repression. Cell Metab. 2009;9(5):461-73.
41. Troadec MB, Ward DM, Lo E, Kaplan J, Domenico I. Induction of FPN1 trancription by MTF-1 revelas a role for ferroportin in transition metal efflux. Blood. 2010;116(22):4657-64.
42. McKie AT. The role of Dcytb in iron metabolism: an update. Biochem. Soc. Trans. 2008;36(6):1239-41.
43. Chen H, Su T, Attieh ZK, Fox TC, McKie AT, Anderson GJ et al. Systemic regulation of Hephaestin and Ireg1 revealed in studies of genetic and nutritional iron deficiency. Blood. 2003;102(5):1893-99.
44. Zoller H, Theurl I, Koch RO, McKie AT, Vogel W, Weiss G. Duodenal cytochrome b and hephaestin expression in patients with iron deficiency and hemochromatosis. Gastroenterology. 2003;125:746-54.
45. Matak P, Zumerle S, Mastrogiannaki M, Balkhi SE, Delga S, Mathieu JRR et al. Copper deficiency leads to anemia, duodenal hypoxia, upregulation of HIF-2a and altered expression of iron absorption genes in mice. PLoS One. 2013;8(3):e59538.
46. Lesbordes-Brion JC, Viatte L, Bennoun M, Lou DQ, Ramey G, Houbron C et al. Targeted disruption of the hepcidin 1 gene results in severe hemochromatosis. Blood. 2006;108(4):1402-05.
47. Parrow NL, Fleming RE. Bone morphogenetic proteins as regulators of iron metabolism. Annu Rev Nutr. 2014;34:77-94.
48. Muckenthaler MU. Erythropoietin mediates hepcidin expression in hepatocytes through EPOR signaling and regulation of C/EBPalpha. Blood. 2008;111(12):5727-33.
49. Finberg KE. Regulation of systemic iron homeostasis. Current Opinion. 2013;20(3):208-14.

17 Magnésio

Pryscila Dryelle Sousa Teixeira
Eduardo de Carli
Célia Colli

INTRODUÇÃO

A adaptação fenotípica às mudanças ambientais é uma característica comum de procariotos e de organismos superiores. Ela ocorre em razão da possibilidade de regulação gênica diferencial em resposta a estímulos externos diversos, como a alimentação.[1]

Nesse contexto, minerais são componentes inorgânicos presentes naturalmente na crosta terrestre e sua distribuição em rochas, rios, lagos e mares é importante para a compreensão da evolução da vida na Terra. Até o século XIX, a importância dos minerais na nutrição humana ainda não tinha sido evidenciada, possivelmente pela inexistência de metodologias analíticas acuradas para sua determinação. A função desses micronutrientes no organismo humano é a de atuar como cofatores em reações enzimáticas, estruturar moléculas de proteínas ou catalisar reações químicas mediadas por enzimas e, ao contrário dos macronutrientes, não contribuem diretamente para a geração de energia no organismo.[2]

Minerais e outros nutrientes regulam a expressão gênica por interação direta com fatores de transcrição ou com outras proteínas regulatórias, modulando assim a transcrição do DNA e a tradução de proteínas, e também, indiretamente, pela modulação da secreção ou ação celular de hormônios (p. ex., insulina, glucagon, glicocorticoides e tri-iodotironina ou T3).

ASPECTOS BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS

O magnésio é o sexto elemento mais abundante da crosta terrestre (O > Si > Al > Fe > Ca > Mg), o quarto cátion mais abundante em organismos vivos (Ca > K > Na > Mg) e o segundo cátion intracelular (Ca > Mg). A grande difusão desse mineral no solo favoreceu sua utilização por plantas, nas quais faz parte da estrutura da clorofila, desempenhando função importante na fotossíntese.[2]

Em humanos, o conteúdo corporal de magnésio aumenta consideravelmente do nascimento à vida adulta, passando de cerca de 760 mg no recém-nascido para aproximadamente 25 g em um indivíduo adulto de 70 kg. Sua distribuição compartimental reflete seu importante papel estrutural nos ossos. Do total de magnésio corporal, 60 a 70% estão no tecido ósseo. Mais de um terço desse conteúdo ocupa sítios da superfície do cristal de hidroxiapatita ou permanece na camada de hidratação desses cristais, 30 a 40% estão nos músculos e outros tecidos moles e apenas 1% do total está no conteúdo extracelular. No plasma, pouco mais da metade do magnésio está na forma livre, um terço está ligado à albumina e o restante está complexado com fosfato, citrato e outros componentes.[3]

As concentrações de magnésio nos fluidos extracelulares são mantidas pelo conteúdo do mineral absorvido da alimentação e também por aquele que é reabsorvido nos rins ou mobilizado das reservas no tecido ósseo. A possibilidade de trocas do magnésio desse tecido com o meio extracelular é essencial para a manutenção das concentrações plasmáticas adequadas, sobretudo em casos de sua deficiência alimentar. Contudo, em condições normais, a concentração plasmática de magnésio é regulada pela absorção intestinal e, principalmente, pela excreção renal – regulador primário da homeostase de magnésio –, e estritamente mantida em uma faixa que varia entre 0,65 e 0,96 mmol/L (Figura 17.1).

Embora as concentrações óssea e muscular de magnésio sejam os melhores indicativos de seu *status* corporal, o acesso a esses compartimentos é difícil e, por isso, na prática clínica e em estudos populacionais, a avaliação

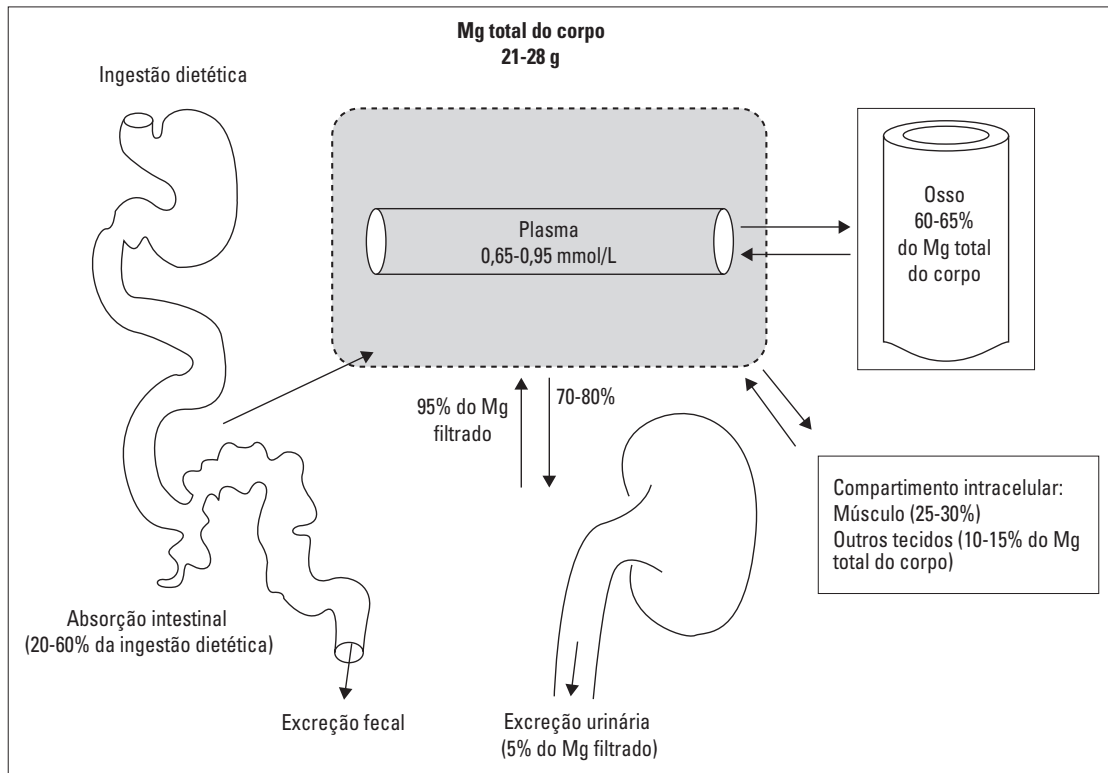



Figura 17.1 Distribuição compartimental do magnésio (Mg). **Fonte:** adaptada de Barbagallo et al.[4]

do estado nutricional relativo ao magnésio é baseada na determinação da concentração do mineral em plasma e eritrócitos. Apesar de a concentração plasmática de magnésio não representar o conteúdo total do mineral no organismo, o que impossibilita a identificação de inadequações em estados iniciais de deficiência, esse é o indicador mais usado. Sugere-se, portanto, a associação de outros biomarcadores; assim, a concentração de magnésio nos eritrócitos pode ser um bom biomarcador para avaliar a adequação da ingestão desse mineral, uma vez que ele caracteriza o estado nutricional pregresso (desde o momento da produção da célula).[5,6]

Outros importantes parâmetros de avaliação incluem a determinação da excreção urinária de magnésio e os testes de retenção, que avaliam a excreção do mineral após uma dose de sobrecarga. Contudo, nos estágios iniciais da deficiência de magnésio, suas concentrações extracelulares podem se apresentar em desequilíbrio com aquelas do meio intracelular: a manutenção do *pool* intracelular de magnésio é priorizada, nos diferentes tipos celulares, mesmo quando as concentrações do mineral no plasma já estiverem reduzidas.[7]

Do total de magnésio assimilado a partir do meio extracelular, 5 a 10% permanecem como íon livre no citosol, enquanto a maior parte é captada por organelas, onde ocorrem muitas das reações bioquímicas dependentes de magnésio. Assim, é compreensível que as funções essenciais do magnésio no organismo, em nível sistêmico e celular, sejam comprometidas tanto em situações de restrição da ingestão alimentar quanto em casos de descompartimentalização corporal decorrente de determinadas doenças crônicas e estados fisiológicos, como será discutido adiante neste capítulo.

O magnésio é essencial, em todos os tipos de tecidos de mamíferos, para uma ampla variedade de funções fisiológicas. Atua em todas as etapas de transcrição e tradução proteica, em grande parte por seu envolvimento na síntese e na utilização de nucleotídeos trifosfatos (ATP e GTP) e na transdução de sinais intracelulares (principalmente aqueles mediados por AMPc e os dependentes de reações de fosforilação). Em tecidos moles, atua como cofator de muitas enzimas envolvidas no metabolismo energético. Assim, o magnésio é necessário tanto na produção de adenosina trifosfato (ATP) quanto na sua utilização, por se ligar ao grupamento fosfato de ATP para formar o complexo ATP-Mg. É esse complexo que, de fato, é utilizado na via glicolítica e é o cofator da maioria das enzimas dependentes de magnésio.[8]

A síntese e a estabilização das moléculas de ácidos nucleicos também necessitam de magnésio, que é fundamental para a atividade de DNA e de RNA polimerases, de topoisomerases e de exonucleases. A manutenção da integridade e do potencial elétrico de membranas celulares – incluindo a transmissão de impulsos nervosos, a

contração e a dilatação de vasos e artérias e a regulação do ritmo cardíaco e o transporte de sódio, potássio e cálcio através de membranas – também dependem de magnésio.[8]

As consequências de pequenas mudanças na concentração intracelular de magnésio podem ser fisiologicamente significantes, como o influxo/efluxo celular de sódio e cálcio e o comprometimento de vias de transdução de sinais. A redução da concentração de magnésio nas células da musculatura lisa e cardíaca, por exemplo, causa importantes alterações na função vascular, induzindo arritmias cardíacas, câimbras musculares e hipertensão (em decorrência do influxo secundário de cálcio, que resulta na despolarização de membranas). Baixas concentrações séricas de magnésio são frequentemente associadas à hipertensão arterial.[9-11]

Na célula, a descompartimentalização do magnésio também pode ocorrer em razão de perdas do seu conteúdo para o meio, o que acontece, por exemplo, quando o magnésio complexado é liberado (após quebra do ATP e em estado de acidose), passando a compor o *pool* de magnésio intracelular livre. O aumento da concentração do íon no citosol facilita seu efluxo.[12]

A proporção com que o magnésio é transportado entre os tecidos é variável e pode, em parte, contribuir para a manutenção das concentrações extracelulares do mineral. Entretanto, grande parte do magnésio corporal contido no meio intracelular (85% do conteúdo corporal total de magnésio) tem efluxo muito lento. Desse modo, para garantir o equilíbrio sistêmico do mineral, a absorção intestinal e a reabsorção renal de magnésio, como já mencionado, devem estar preservadas. Além disso, para a manutenção da sua homeostase celular, complexos de proteínas (muitos dos quais ainda pouco elucidados) precisam atuar em harmonia, de forma que sua concentração no meio intracelular se mantenha constante.[13]

A compreensão da regulação da homeostase de magnésio pela expressão de canais e proteínas responsáveis pelo seu trânsito celular é fundamental para a escolha ou a implementação do melhor tratamento em condições patológicas específicas. Um bom exemplo já bem estabelecido é a escolha da via para administração de sulfato de magnésio ($MgSO_4$) no tratamento de pré-eclâmpsia e eclâmpsia, a qual deve ser intramuscular ou intravenosa, em vez de oral. Nos casos de eclâmpsia, há grande necessidade de magnésio nos tecidos para controle da hipertensão arterial e da contratilidade cardíaca.[14]

A compreensão dos padrões de expressão gênica nos tecidos em resposta à depleção de magnésio poderá contribuir para o melhor entendimento das consequências fisiológicas da deficiência desse mineral. Além disso, permitirá a identificação de novos parâmetros de avaliação do seu *status* corporal e as condições em que a suplementação seria indicada.

Absorção intestinal de magnésio

As ingestões diárias de referência (DRI)[15] definem que, para mulheres e homens adultos, a necessidade média estimada (EAR) de magnésio é, respectivamente, 265 mg/dia e 350 mg/dia; já a recomendação dietética diária (RDA) é de 320 mg/dia e 420 mg/dia e o limite superior tolerável de ingestão (UL), de 350 mg/dia de magnésio suplementar. Entretanto, alta prevalência de inadequação de ingestão alimentar do mineral é observada tanto no Brasil – 70% segundo a *Pesquisa de orçamento familiar 2008-2009*[16] – quanto em outros países do mundo.[17]

A absorção intestinal de magnésio acontece primariamente no jejuno e no íleo, ainda que o cólon e o ceco também possam contribuir para a captação do conteúdo proveniente da alimentação. A eficiência da absorção pode variar muito – de 20 a 60% –, a depender da quantidade ingerida e do *status* corporal. A relação entre o magnésio ingerido e o magnésio absorvido tem proporções lineares, embora a sua biodisponibilidade seja reduzida por minerais como zinco, cálcio e fosfato, além das fibras (quando o consumo é > 40 g/dia). Enquanto a redução na absorção de magnésio pelo zinco (e outros minerais) é atribuída à inibição competitiva entre esses elementos, o efeito da fibra é decorrente da capacidade de ligação do magnésio ao fósforo das moléculas de fitato, formando um complexo de baixa solubilidade. Contudo, alimentos ricos em fibras são também, em geral, fontes de magnésio, o que frequentemente compensa a menor biodisponibilidade decorrente desse tipo de interação.[18]

O magnésio é geralmente absorvido como íon, por transporte ativo ou passivo, dependendo de sua quantidade na alimentação. O transporte paracelular (passivo) é predominante quando a concentração de magnésio no lúmen está acima de 20 mEq/L. Esse transporte não é saturável e é determinado pelo gradiente eletroquímico (relacionado com o transporte de sódio) ou secundário ao movimento da água no epitélio intestinal, que carreia os solutos (incluindo magnésio) na mesma direção – transporte conhecido como arraste de solvente.[19] O transporte passivo permite que o magnésio também seja secretado (pelo sistema antiporte Na^+/Mg^{2+}) ao longo do trato gastrintestinal. Praticamente todo o magnésio secretado é reabsorvido.[20]

Observações experimentais de que há saturação na absorção intestinal e de que ocorre grande perda fecal de magnésio em indivíduos com hipomagnesemia genética, que não respondem à suplementação oral, tornaram evidente a existência de um mecanismo de transporte ativo

do mineral, complementar ao mecanismo de transporte passivo.[21,22] O transporte ativo ocorre por meio de transportadores no epitélio intestinal e é predominante quando as concentrações intraluminais de magnésio são baixas, como quando a alimentação é restrita no mineral. Foram identificados, no intestino e nos rins, dois importantes canais da subfamília TRPM (*transient receptor potential melastatin*), caracterizados pela presença de seis domínios transmembrana, com região em forma de poro conservada – TRPM6 e TRPM7.[23,24] A afinidade desses transportadores pelo magnésio os torna importantes no controle da absorção intestinal e reabsorção e excreção do mineral, atuando, assim, como componentes essenciais na manutenção da sua homeostase (Figura 17.2).

Excreção de magnésio

A filtração glomerular do magnésio plasmático é responsável pela excreção de qualquer excesso do mineral na circulação. Por outro lado, em condições de restrição alimentar, a maior parte do filtrado é reabsorvida. Ao longo dos néfrons estão dispostas diferentes vias de transporte:

- Nos túbulos proximais ocorre reabsorção inicial (15 a 25% do filtrado) por mecanismo passivo dependente de água e sódio.
- Na alça de Henle, principal sítio de reabsorção (65 a 75% do filtrado), esse processo acontece por mecanismo paracelular, mediado por duas proteínas da família das claudinas – a claudina-16 (ou paracelina-1) e a claudina-19.
- No túbulo contorcido distal ocorre a menor parte da reabsorção do magnésio por transporte ativo paracelular (5 a 10% do filtrado total ou 70 a 80% do magnésio não reabsorvido na alça de Henle).

Embora tenha pequena contribuição para a reabsorção renal total de magnésio, é no túbulo contorcido distal que a concentração final do mineral na urina é determinada.[26]

O mecanismo de regulação da reabsorção de magnésio é mediado por receptores sensíveis a cátions divalentes (como o CaSR, *calcium/polycation-sensing receptor*). Quando as concentrações plasmáticas de magnésio estão elevadas, a reabsorção é inibida pela ativação desses receptores da borda peritubular das células do túbulo contorcido distal e, desse modo, a concentração urinária do mineral aumenta. O contrário acontece quando as concentrações plasmáticas de magnésio estão baixas.[27] Além disso, assim como no intestino, nos túbulos contorcidos distais dos rins, o canal TRMP6 exerce importante atividade de controle de reabsorção de magnésio (Figura 17.2).

Além da concentração plasmática do próprio magnésio, outros fatores são capazes de regular a sua reabsorção renal, sendo o mais importante deles o controle hormonal. O paratormônio (PTH) e a calcitonina, hormônios reguladores da homeostase de cálcio, modulam a reabsorção de magnésio no túbulo contorcido distal e, embora ainda não se saiba quais são os mecanismos moleculares envolvidos, sabe-se que esse hormônio não altera a expressão do gene *TRPM6*. A aldosterona, por promover redistribuição compartimental de magnésio e de outros eletrólitos, indiretamente afeta a reabsorção de magnésio nos néfrons.[28]

Ações hormonais diretas sobre a expressão de *TRPM6* nos rins e no intestino têm também sido atribuídas à

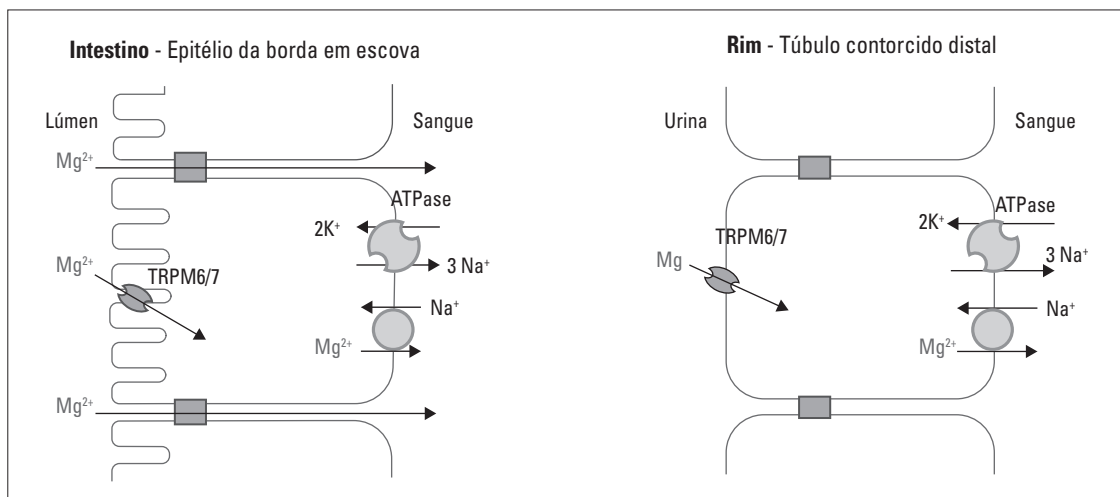



Figura 17.2 Mecanismos de transporte do magnésio no intestino (absorção do mineral) e rim (excreção). Os TRPM6/7 (*transient receptor potential melastatin 6/7*, ou transportadores iônicos com afinidade pelo magnésio, em tradução livre) são componentes essenciais na manutenção da homeostase desse mineral. ATPase: adenosina trifosfatase. **Fonte:** adaptada de Schlingmann et al.[25]

insulina e ao estrógeno. A ação de ambos os hormônios parece promover aumento da (re)absorção de magnésio, possivelmente mediada pelo estímulo secundário à expressão e/ou atividade do canal TRPM6.[29] Embora reste muito a ser elucidado quanto a esses mecanismos, há indícios de que alterações no *status* de magnésio observadas tanto em pacientes diabéticos quanto em mulheres pós-menopausadas possam ser decorrentes da redução da expressão desse canal.[30]

Diante do exposto, é compreensível que, além da inadequação alimentar, outras condições fisiopatológicas interfiram na homeostase do magnésio, incluindo aquelas que promovem disfunção renal (insuficiência renal crônica, diabete melito, necrose tubular aguda), complicações gastrointestinais com má absorção ou diarreia (doença celíaca, síndrome do intestino curto, alcoolismo) e distúrbios endócrinos e metabólicos (hipoparatireoidismo, pancreatite aguda, trauma, síndrome da realimentação etc.). Além disso, a hipomagnesemia é também associada ao uso crônico de inibidores das bombas de próton (indicados para doenças pépticas), diuréticos tiazídicos e de alça (que inibem a reabsorção renal de magnésio) e antibióticos aminoglicosídicos.[29,31]

Homeostase de magnésio na célula

O magnésio é um íon predominantemente intracelular. Assim, pequenas reduções de sua concentração no citosol levam à sua captação do meio extracelular e o conteúdo intracelular é recuperado. Estudos experimentais em roedores só demonstraram redução da concentração intracelular de magnésio em condições de grande restrição alimentar (90% de restrição ou oferta de cerca de 50 mg de Mg/kg de ração por, no mínimo, 30 dias). Uma pequena diminuição do conteúdo intracelular de magnésio é observada quando a sua concentração plasmática é reduzida em 0,2 mmol/L (redução de aproximadamente 25% no valor médio do intervalo de normalidade).[32]

Tanto em ratos recém-desmamados como em ratos adultos jovens, a restrição dietética marginal de magnésio (30 e 70% das recomendações para roedores por 30 ou 60 dias, respectivamente) promoveu redução da excreção urinária sem modificação de suas concentrações plasmáticas e eritrocitárias.[33,34] Nessas situações de restrição dietética de magnésio ocorre, primariamente, o comprometimento de funções fisiológicas em que há dependência do mineral no ambiente extracelular.

Na gestação, que é um período de grandes adaptações fisiológicas, a mulher está vulnerável à deficiência de minerais. Rocha et al.[35] não observaram alterações nas concentrações plasmáticas, eritrocitárias e urinárias de cálcio e de magnésio em gestantes saudáveis. Entretanto, em gestantes com pré-eclâmpsia,[36] foram observadas concentrações plasmáticas mais altas de magnésio. Por esse motivo, os autores sugerem que, nos serviços de saúde, as gestantes que apresentam altas concentrações plasmáticas de magnésio deveriam ser acompanhadas com avaliações mais acuradas, para que se diminua o risco de pré-eclâmpsia.

Hiperexcitabilidade neuromuscular, hipocalcemia e hipocalemia são algumas das alterações frequentemente associadas com hipomagnesemia.[29] Complicações associadas à deficiência subclínica de magnésio em longo prazo ainda estão pouco esclarecidas. Como exemplo, pode-se destacar alterações na homeostase da glicose, hipertensão, aterosclerose e alterações na eritropoese que podem explicar muitos dos mecanismos pelos quais o *status* de magnésio se modifica em muitas condições clínicas crônicas, incluindo a obesidade.[29,36-38] Na restrição dietética grave de magnésio, a perda de massa óssea foi uma das mais importantes alterações observadas tanto em modelos murinos como em estudos com tecido ósseo. Supõe-se que, nessa condição, para a manutenção das concentrações plasmáticas adequadas de magnésio, ocorra aumento desproporcional da diferenciação dos osteoclastos, responsáveis pela degradação óssea e liberação do magnésio para o plasma.[39] Nesse contexto, é importante destacar que a osteoporose é uma das doenças crônicas frequentemente associadas com a inadequação no consumo de magnésio.[40]

Em todos os tecidos, tanto em membranas externas quanto em organelas, o mecanismo de transporte de magnésio é mediado por canais e trocadores. Enquanto os primeiros estão predominantemente relacionados com o acúmulo de magnésio, os trocadores medeiam sua excreção. A Tabela 17.1 apresenta os principais canais, carreadores, antiportes e trocadores responsáveis pelo fluxo do magnésio entre compartimentos.

MAGNÉSIO E EXPRESSÃO GÊNICA

Nos últimos 15 anos, estudos genéticos possibilitaram a identificação de vários genes essenciais no controle da homeostase do magnésio. Muito do que se sabe está relacionado a alterações causadas por mutações e polimorfismos de nucleotídeo único (SNP, *single nucleotide polymorphisms*) sobre a atividade de proteínas envolvidas com o seu transporte.

As alterações geneticamente determinadas das concentrações plasmáticas de magnésio podem ser decorrentes tanto do aumento da sua excreção urinária quanto da redução de sua absorção intestinal. A associação dessas alterações especialmente com diabete e hiperten-

Tabela 17.1 Transportadores de magnésio em organismos eucariotos

	Família	Membros	Tipo	Referência
		Mecanismos de entrada		
Membrana celular	TRPM	TRPM6 TRPM7	Canal Canal	Schlingmann et al. (2002)[24] Nadler et al. (2001)[41]
	Claudinas	Claudina 16 (PCLN-1) Claudina 19	Canal Canal	Simon et al. (1999)[42] Hou et al. (2009)[43]
	MagT1	MagT1	Canal	Goytain e Quamme (2005)[44] Zhou e Clapham (2009)[45]
	SLC41	SLC41A1 SLC41A2	Carreador Carreador	Goytain e Quamme (2005)[44] Sahni et al. (2007)[46]
	ACDP	ACDP1 ACDP2	Carreador Carreador	Goytain e Quamme (2005)[44]
	NIPA	NIPA1 (SPG6) NIPA2	Carreador Carreador	Goytain et al. (2007)[47] Goytain e Quamme (2008)[48]
	Huntingtina	Huntingtina 1 (HIP14) HIP14L	Carreador Carreador	Goytain e Quamme (2008)[48]
Mitocôndria	Mrs2	Mrs2/AtMrs2, Lpe10	Canal	Kolisek et al. (2003)[49]
Complexo de Golgi	MMgt	MMgT1 MMgT2	Canal Canal	Goytain e Quamme (2008)[48]
		Mecanismos de saída		
Membrana celular	Trocador Na^+/Mg^{2+}	-	Sistema antiporte	Gunther et al. (1984)[50] Tashiro e Konishi (1997)[51] Cefaratti et al. (1998)[52]
	SLC41	SLC41A1	Carreador	Kolisek et al. (2008)[53]

Fonte: Romani.[12]

são[54] tem contribuído para o entendimento do papel do magnésio em funções fisiológicas ainda pouco esclarecidas. Uma vez que muitos casos de hipomagnesemia hereditária permanecem inexplicados, espera-se que outros genes sejam ainda identificados como importantes reguladores da homeostase do magnésio. O papel direto do magnésio sobre a expressão de genes alvo é, portanto, um profícuo campo de pesquisas.

Canais

A entrada de magnésio em todos os tipos celulares ocorre, fundamentalmente, por sua passagem por canais que têm alta especificidade pelo íon. Embora a maioria desses canais esteja localizada na membrana da célula, alguns são específicos de organelas como a mitocôndria e o complexo de Golgi, e muitos deles são também permeáveis a outros cátions.[12]

Canais TRPM

Os canais de receptores transientes de potencial (TRP, *transient receptor potencial channel*) são largamente expressos em diversos tecidos e células e estão envolvidos em inúmeros processos fisiológicos, dentre os quais a homeostase de íons. Esses canais compõem uma grande família subdividida em outras sete, sendo uma delas a subfamília dos canais de receptores transientes de potencial do tipo melastatina. Esses canais iônicos estão presentes na maioria dos tecidos e ainda subdividem-se em quatro grupos: TRPM1/3, TRPM2/8, TRPM4/5 e TRPM6/7.[20,55,56]

Os TRPM que apresentam permeabilidade seletiva pelo Mg^{2+} e que, portanto, participam da regulação da homeostase do mineral são o TRPM6 e o TRPM7, como já mencionado. O TRPM6 está especificamente localizado no cólon e no túbulo contorcido distal do néfron, enquanto o TRPM7 está presente em quase todos os tecidos.[57,58] Por esse perfil de distribuição, o TRPM6 tem um papel no controle da homeostase corporal de magnésio via absorção intestinal e reabsorção renal, ao passo que o TRPM7 está mais associado ao controle da homeostase intracelular.

Embora esses canais compartilhem grande número de similaridades em suas estruturas e funções, eles diferem em aspectos que variam desde a sua localização até o seu papel na modulação hormonal.

TRPM6

O TRPM6 tem propriedades eletrofisiológicas similares às do TRPM7, mas suas funções não se sobrepõem. O TRPM6 é capaz de se heterodimerizar com o TRPM7, e essa interação parece promover a translocação de TRPM6 de um compartimento intracelular para a superfície da célula. O TRPM6 pode modular a função do TRPM7, mas o contrário não acontece. A função do TRPM6 como mediador do transporte ativo de magnésio na absorção intestinal e na reabsorção renal o torna muito importante quando a quantidade ingerida de magnésio por meio de alimentos é baixa. Ao contrário do TRPM7, o TRPM6 está localizado exclusivamente no cólon e nos túbulos contorcidos distais.[12]

O gene que codifica o TRPM6 localiza-se no cromossomo 9 (*locus* 9q21.13),[24] primariamente identificado como sítio de várias mutações gênicas em pacientes com hipomagnesemia com hipocalcemia secundária (HSH, *hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia*). A HSH é uma doença autossômica recessiva rara caracterizada pela perda da regulação da excreção de Mg^{2+} e Ca^{2+}. Mutações no canal TRPM6 prejudicam a absorção intestinal de magnésio, bem como a sua reabsorção renal, causando hipomagnesemia grave o suficiente para alterar a regulação do metabolismo do cálcio pela paratireoide. Esse quadro instala um estado de hipomagnesemia com hipocalcemia secundária.[59]

A regulação da expressão gênica/atividade do TRPM6, da mesma maneira que acontece com o TRPM7, é dependente das concentrações intracelulares de magnésio, embora ainda não se saiba o mecanismo exato de regulação *in vivo*. Sabe-se que o magnésio alimentar interfere de diferentes formas na regulação do TRMP6 do cólon e dos rins. A restrição alimentar de magnésio resulta no aumento da expressão de TRPM6 nesses órgãos, enquanto o consumo por roedores de rações suplementadas com o mineral acarreta o aumento da expressão do canal no cólon, mas a diminuição nos rins.[60]

Já foi descrito que estrógeno, fator de crescimento epidérmico (EGF, *epidermal growth fator*) e moléculas de sinalização celular são capazes de modular a atividade do TRPM6. Em condições de baixas concentrações circulantes de estrógeno, há inibição do TRPM6, uma vez que esse hormônio aumenta a expressão gênica desse canal, sem interferir na expressão gênica do *TRPM7*.[61] O aumento da expressão do receptor da atividade da proteína C quinase ativada (RACK1 – ancorador de outras proteínas em locais específicos, incluindo membrana e núcleo celulares) resulta em uma ligação deste ao domínio alfa-quinase do TRPM6, o que possivelmente promove efeito inibitório da atividade do canal. Por fim, os mecanismos pelos quais o EGF (fator de crescimento que estimula o crescimento, proliferação e diferenciação celular que também atua como hormônio magnesiotrópico) modula a atividade do TRPM6 ainda não estão claramente descritos, porém há evidências de que envolvem a via de sinalização ERK1/2 (*extracelular signal-regulated protein kinases 1 and 2*).[62]

TRPM7

O gene homólogo à proteína TRPM, localizado no cromossomo 15 (*locus* 15q21), codifica o TRPM7, que é formado por 1.865 aminoácidos, distribuídos em seis domínios transmembrana e com ambas as terminações (C– e N–) internalizadas, o que o torna apto a atuar tanto como canal de íons quanto como uma serina/treonina quinase. A atividade de quinase é essencial para a função de canal e permite que ainda participe da sinalização de vias celulares. Além disso, a ligação do mineral ao ATP promove ativação do TRPM7, em baixas concentrações de magnésio celular.[12]

O TRPM7 é essencial como canal, não só permeável ao magnésio, como também a uma ampla gama de cátions divalentes, incluindo zinco, cobalto e manganês. No entanto, diferentemente dos outros canais da família TRP, este se mostrou mais permeável ao magnésio do que ao cálcio. Quando o meio extracelular não contém magnésio, o TRPM7 pode também conduzir cátions monovalentes, como o Na^{+}.[12]

Em estudo com células que sofreram deleção do gene *TRPM7*, a deficiência intracelular de magnésio foi observada mesmo quando o meio era rico no mineral, demonstrando a importância desse canal para a internalização de Mg^{2+} na célula.[23] Em linfócitos, a mudança de conformação dessa proteína resultou em bloqueio da progressão do ciclo celular.[63] Camundongos que sofrem deleção do domínio quinase do TRPM7 morrem ainda no útero, ao passo que os animais heterozigotos desenvolvem hipomagnesemia.[64]

Tanto a atividade do canal quanto sua expressão gênica podem ser moduladas pelo conteúdo intracelular de magnésio e pelo complexo ATP-Mg, mecanismo pelo qual ele atua como sensor do mineral.[25] Estudo pioneiro de Nikonorova et al.[65] demonstrou como o magnésio atua como regulador pós-transcricional da expressão gênica dos canais TRPM7: no sentido 5' do RNAm que codifica a proteína, há duas uORF (*upstream open reading frames*, região de leitura de fase aberta a montante) que atuam em conjunto para inibir a tradução quando as concentrações intracelulares de magnésio estão altas. Quando há pouco magnésio na célula (condição em que a atividade enzimática desse canal é importante), por meio

desse mecanismo de regulação, a tradução do canal é aumentada, facilitando o influxo de magnésio do meio extracelular (Figura 17.3).

Além da regulação da expressão do gene *TRPM7* pela concentração intracelular do próprio mineral, há ainda a regulação da sua função mediada pelo 4,5-bifosfato de fosfatidilinositol (PIP2), substrato da fosfolipase C (PLC – enzima envolvida em vias de transdução de sinais intracelulares). Demonstrou-se que a hidrólise do PIP2 inativa o canal TRPM7. A PLC e o TRPM7 têm seus sítios catalíticos interligados e a inativação deste pela hidrólise do substrato catalítico da PLC reitera a influência do magnésio nos processos de sinalização celular dependentes de reações de quinases.[66]

Figura 17.3 Regulação da expressão do gene *TRPM7* pela concentração intracelular de Mg^{2+}. Há duas fases de leitura aberta (uORF) no sentido 5' da região não traduzida (UTR) do RNAm que codifica o *TRPM7*. Quando as concentrações de magnésio estão altas, há um bloqueio sinérgico da tradução da proteína pelo desligamento do ribossomo quando este atinge o final das duas uORF, antes de chegar ao códon de iniciação da tradução da proteína. Entretanto, quando as concentrações de magnésio estão baixas, as regiões uORF permitem que o ribossomo continue a tradução gênica. **Fonte:** adaptada de Nikonorova et al.[65]

Paracelina-1

A paracelina-1 (claudina-16 ou PCLN1) é uma proteína de 305 aminoácidos codificada pelo gene *PCLN1*, localizado na região cromossômica 3q27. Análises comparativas das sequências éxon-íntron desse gene em ratos e em humanos demonstram homologia completa entre as duas espécies, indicando sua preservação evolucionária.[42] A paracelina-1 é uma proteína membro da família das claudinas, que compreende um grupo de proteínas de junção celular (tipo *tight junction*) com quatro domínios transmembrana, coordenados por duas dobras extracelulares e terminações C– e N– na porção citoplasmática. A paracelina-1, especificamente, está localizada na porção ascendente da alça de Henle. Grande parte da reabsorção paracelular de magnésio nos rins é mediada por essa proteína.[12]

Mais de vinte mutações que alteram a permeabilidade da PCLN1 já foram identificadas.[67] Mutações de perda de função estão associadas com uma doença renal hereditária que promove aumento da excreção urinária de magnésio e cálcio: a hipomagnesemia com hipercalciúria e nefrocalcinose familiar (FHHNC, *familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis*). Embora o papel específico da PCLN1 não esteja claro, admite-se que essa proteína tenha grande importância na regulação da absorção do magnésio não só nos rins, mas também no intestino.[12]

Carreador – SLC41A1

O transportador de magnésio SLC41A1 (*solute carrier family 41 – magnesium transporter – member 1*) é membro da família de carreadores solúveis que, em humanos, compreende dez domínios transmembrana, dos quais dois são homólogos ao MgtE (proteína de membrana transportadora de magnésio de algumas bactérias). O gene *SLC41A1* está localizado na posição cromossômica 1q32.1 e codifica a proteína de 513 aminoácidos. Sua transcrição é estimulada em condição de baixa concentração intracelular de magnésio. Em ratos, ela é expressa em diversos tecidos: cérebro, rins, fígado, cólon e intestino delgado. Quando esses animais foram alimentados com rações pobres em magnésio, observou-se aumento da expressão de SLC41A1 nos rins, cólon e coração. Embora essa proteína não tenha seletividade específica para o magnésio, o transporte desse mineral por ela parece ser preferencial. Em razão das observações experimentais expostas, o SLC41A1 parece ser um importante regulador do transporte intracelular de magnésio.[53]

VARIAÇÕES GENÉTICAS RELACIONADAS À HOMEOSTASE DE MAGNÉSIO

A hipomagnesemia hereditária compreende um número de doenças raras, descritas com frequência cada vez maior em razão da disponibilidade de ferramentas de biologia molecular. Elas decorrem de defeitos em genes relacionados tanto com a absorção gastrintestinal quanto com a filtração renal ou com a distribuição celular do magnésio.[29,59]

A síndrome de Gitelman, a mais comum das hipomagnesemias hereditárias (1 a cada 40 mil nascimentos), é associada com um defeito primário no gene *SLC12A3*, que codifica o cotransportador de NaCl sensível aos tiazídicos (NCCT, *NaCl cotransporter thiazide-sensitive*).

Esse transportador é expresso exclusivamente na membrana apical de células da alça de Henle, e o prejuízo na reabsorção de cloreto de sódio causado pela disfunção dessa proteína promove poliúria e redução do volume plasmático. Como consequência do desequilíbrio eletrolítico que cursa com a doença, há hiperativação do sistema renina-angiotesina-aldosterona. Há indícios de que a hiperaldosteronemia que acompanha a doença seja responsável pela redução da expressão/atividade do TRPM6 nas células renais do túbulo contorcido distal. Entretanto, o mecanismo pelo qual esse hormônio poderia afetar a expressão e/ou a atividade do TRPM6 ainda não está esclarecido.[28,68]

Defeitos nos genes que codificam as claudinas 16 e 19 (CLDN16 e CLDN19 – envolvidas no mecanismo paracelular de reabsorção do magnésio na alça de Henle) e o receptor sensível aos cátions divalentes (CaSR, modulador da excreção urinária de magnésio) estão incluídos entre outras causas monogênicas de hipomagnesemia hereditária. A HSH, causada por mutações de perda de função do gene *TRPM6*, foi até então identificada em apenas cinquenta casos. Apesar disso, o papel crítico desse gene no transporte de magnésio pôde ser evidenciado nesses poucos pacientes, que apresentaram concentrações de magnésio plasmático de cerca de 0,2 mmol/L, ou seja, muito baixas.[59]

Alguns determinantes genéticos da magnesemia na população geral foram identificados pelo estudo de Meyer et al.,[69] uma metanálise de associação de mais de 2,5 milhões de SNP com concentrações plasmáticas de magnésio em mais de 15.000 indivíduos. Variantes em seis regiões genômicas (SNP próximos ou na região dos genes *MUC1*, *ATP2B1*, *DCDC5*, *TRPM6*, *SHROOM3* e *MDS1*) foram associadas com hipomagnesemia. Curiosamente, desses genes, apenas o *TRPM6* era sabidamente envolvido com o metabolismo de magnésio. Ainda que, por ora, o papel dos genes *ATP2B1* (remoção celular de íons de cálcio) e *SHROOM3* (supostamente envolvido com o maquinário proteico de filtração glomerular) sobre a homeostase de magnésio seja biologicamente plausível, é preciso elucidar se os genes *MUC1*, *DCDC5* e *MDS1* participam direta ou indiretamente no metabolismo do mineral.[69]

Em função da relação intrínseca da homeostase do magnésio com o metabolismo da glicose, a investigação do efeito interativo entre a ingestão alimentar de magnésio e a presença de variações em genes relacionados com seu metabolismo tem contribuído para o entendimento dos fatores preditores do diabete melito tipo 2 (DM2) (revisão em Hruby et al.[70]). Song et al.,[71] por exemplo, descrevem que carreadores de dois alelos comuns do gene *TRPM6* (Val1393Ile no éxon 29 – rs3750425 e Lis1584Glu no éxon 30 – rs2274924) podem ter risco aumentado de DM2 quando expostos a dietas pobres em magnésio.

Nair et al.,[72] em estudo feito com amostra proveniente de uma coorte de gestantes (Berlin Birth Cohort), observaram que carreadoras do alelo variante em relação ao SNP rs2274924 do *TRPM6* apresentavam maior prevalência de diabete gestacional. Em teste de funcionalidade da variante *in vitro*, esses autores descrevem que a substituição de aminoácidos resultante desse polimorfismo altera o sítio de fosforilação do TRPM6 após a ativação da cascata de sinalização da insulina. Como consequência, há a produção de um canal TRPM6 insensível aos efeitos de estímulo da sua atividade em resposta à ação do hormônio. Estudo observacional com mais de 50.000 indivíduos residentes na Europa e nos Estados Unidos observou que as variantes rs3750425 e rs2274924 do *TRPM6* associaram-se com maiores valores de glicose de jejum, mesmo na ausência de pacientes com diabetes melito na amostra.[73]

Os muitos dados epidemiológicos que descrevem forte correlação entre baixa ingestão de magnésio e diminuição da sensibilidade à insulina e as evidências de que a própria insulina regula as concentrações intracelulares de magnésio levam à reflexão sobre quais benefícios o maior consumo alimentar de magnésio poderia trazer aos indivíduos com DM2. Sabe-se que indivíduos que apresentam essa doença têm a compartimentalização do magnésio alterada (baixas concentrações intracelulares do mineral); entretanto, ainda não está claro qual a causa dessas alterações.[74] Não se sabe, por exemplo, se a doença altera a utilização do magnésio ou se os problemas primários na homeostase do mineral predispõem à instalação da doença. O risco individual para o DM2 varia muito entre os indivíduos, e a compreensão dos intricados processos de interação gene-ambiente que determinam o risco para o desenvolvimento de DM2 possibilitará o desenho de melhores estratégias de prevenção e tratamento dessa condição.

ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO GÊNICA DECORRENTES DA INGESTÃO DE MAGNÉSIO

A deficiência de magnésio não é incomum. Graham et al.[75] descreveram que mais da metade da população mundial apresenta deficiência de alguns minerais, dentre os quais o magnésio. No Brasil, entre estudantes universitários aparentemente saudáveis, Sales et al.[37] observaram alta prevalência de deficiência subclínica de magnésio (42%), provavelmente associada à alta probabilidade de inadequação da ingestão alimentar do mineral observada pelos autores.

Sabe-se que o magnésio atua por mecanismos diretos e indiretos sobre a expressão gênica dos canais que

regulam sua própria homeostase. Por outro lado, padrões de expressão gênica global decorrentes da depleção tecidual de magnésio podem ocorrer de maneira independente do *status* do mineral. Alguns autores propõem que modelos de restrição alimentar ou de suplementação de magnésio em curto prazo possam ser mais apropriados para a investigação dos efeitos diretos isolados desse mineral nas células de diversos tecidos. Nesse sentido, muitos resultados de estudos com modelos de deficiência de magnésio crônica podem ser mascarados pela presença de complicações sistêmicas dela decorrentes, como as alterações no crescimento celular, no equilíbrio eletrolítico, aumento do estresse oxidativo e da inflamação e quadro de resistência celular à ação da insulina.[76,77]

Os perfis de expressão gênica diferencial foram avaliados em número limitado de estudos em tecidos de animais expostos à restrição dietética de magnésio (Tabela 17.2). Pelas observações feitas em camundongos geneticamente predispostos à deficiência de magnésio (gerados por cruzamentos seletivos), Ozgo et al.[76] sugerem que respostas fisiopatológicas à restrição do mineral podem ser distintas entre linhagens de animais com diferentes *backgrounds* genéticos. Ainda assim, a restrição dietética grave de magnésio e de curto prazo pareceu induzir sistematicamente respostas fisiológicas condizentes com alterações precoces de aumento do estresse oxidativo, de alterações no fluxo de íons (sobretudo de cálcio) e no remodelamento dos diferentes tecidos avaliados.[76-81] Em longo prazo, a restrição crônica e moderada de magnésio dietético induziu alterações semelhantes no perfil de expressão gênica hepática, corroborando a hipótese de que o envelhecimento tecidual precoce acompanha a deficiência do mineral.[82]

Em estudo piloto com humanos, foram descritos os perfis transcriptômicos e proteômicos de amostras de sangue e urina obtidas de 14 indivíduos com sobrepeso submetidos à suplementação oral com magnésio (500 mg/dia) em curto prazo (quatro semanas). Os autores observaram que a suplementação esteve associada com aumento da expressão de 24 genes e redução da expressão de outros 36, quando comparada ao placebo. Embora muitos desses genes diferencialmente expressos fossem sabidamente envolvidos em vias do metabolismo de glicose e da resposta inflamatória, mais da metade deles tinha função desconhecida. A análise da urina indicou padrões proteômicos diferenciados em resposta à suplementação de magnésio, o que corroborou os achados de alterações sistêmicas e moleculares após a suplementação do mineral. Segundo os autores, a próxima etapa seria a de identificação das proteínas excretadas.[83]

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A compreensão dos mecanismos da homeostase sistêmica e celular de magnésio avançou significativamente na última década, apontando perspectivas de interações

Tabela 17.2 Estudos de expressão gênica diferencial (*microarray* de DNAc) em modelos animais de restrição de magnésio

Modelo	Tecido	*Array*	Expressão gênica diferencial*	Referência
Camundongos OF1 (fêmeas de 8 semanas) com restrição dietética de Mg (30 mg/kg de ração) por curto prazo (3 dias)	Mucosa intestinal	1.176 genes com funções conhecidas (*Atlas*™ *Mouse 1.2 Array*, Clontech)	↑ Ciclina G2 (regulador negativo do ciclo celular) ↑ Proteína 78 regulada pela glicose ↑ Ativador do receptor de TNF associado ao fator nuclear kappa-B (induzidas por estresse oxidativo) ↑ Glutationa peroxidase 3 (enzima antioxidante) ↓ Citoqueratina 19 (associada com redução da proliferação e diferenciação celular)	Zimowska et al. (2002)[81]
Ratos Wistar (machos de 3 semanas) com restrição dietética de Mg (35 mg/kg de ração) por curto prazo (2 dias)	Timo	1.176 genes com funções conhecidas (*Atlas*™ *Rat 1.2 Array*, Clontech)	↑ Citocromo c oxidase (cadeia respiratória mitocondrial) ↑ Glutationa transferase e cobre-zinco superóxido dismutase (enzimas antioxidantes) ↑ HSP84 e HSP70 (proteínas de choque térmico, inibidoras da agregação proteica intracelular) ↑ GADD45 (induzida por dano ao DNA) ↓ Cotrasportador de Na/P 1	Petrault et al. (2002)[77]
Camundongos Swiss CD1 (machos de 3 semanas) com restrição dietética de Mg (30 mg/kg de ração) por curto prazo (14 dias)	Epidídimo	150 genes da resposta celular ao estresse (*Atlas*™ *Mouse Stress Arrays*; Clontech)	↓ FKBP12 e PDI (expressão reduzida durante a ativação da via do *fator* transformador *de crescimento* beta1 – *TGF*-beta1) ↓ RAD23B, gp96 e CCT calnexina (proteínas de choque térmico e ligantes de Ca intracelular). ↑ p38-MAPK (transdutora de sinais celulares, incluindo a via do *TGF*-beta1)	Vernet et al. (2004)[78]

(continua)

Tabela 17.2 Estudos de expressão gênica diferencial (*microarray* de DNAc) em modelos animais de restrição de magnésio (*continuação*)

Modelo	Tecido	*Array*	Expressão gênica diferencial*	Referência
Camundongos C57BL/6 (fêmeas de 10-12 semanas) com restrição de Mg (90% de restrição) por 21 dias	Pulmão	1.176 genes com funções conhecidas (*Atlas*™ *Mouse 1.2 Array*, Clontech)	↑ *NF-E2-related factor-2* (gene ativador do potencial antioxidante) ↑ cdc42, CASP2, CyclinT1 (regulador do ciclo e crescimento celular, da síntese proteica e de ácidos nucleicos e da apoptose) ↓ distroglicano, integrina alfa 6, P-selectina (moléculas de adesão celular)	Nasulewicz et al. (2004)[80]
Camundongos C57BL/6 NHsd (fêmeas de 6 semanas) com restrição dietética de Mg (50 mg/kg de ração) por curto prazo (26 dias)	Pulmão	274 genes de citocinas e receptores celulares (PIQOR™ *Cytokines & Receptors Mouse Microarray*, Memorec Biotec GmbH)	↑ G-CSF-R (regulador da diferenciação e proliferação de células endoteliais, antiapoptótico) ↑ CCL4 (quimioatrativo e coativador de monócitos e linfócitos) ↓ Osteoponina (proteína com ação inibidora da produção excessiva de óxido nítrico por macrófagos alveolares)	Sabbagh et al. (2005)[79]
Camundongos (fêmeas de 4 meses) deficientes em Mg com restrição dietética do mineral (30 mg/kg de ração) por curto prazo (7 dias)	Rins	1.176 genes com funções conhecidas (*Atlas*™ *Mouse 1.2 Array*, Clontech)	↓ Fatores de transcrição básicos ↓ Fatores de crescimento ↓ Osteoponina (proteína inibidora da calcificação renal) ↑ Receptor A de colecistoquinina (responsiva à função renal prejudicada) ↑ Receptor do hormônio do crescimento	Ozgo et al. (2007)[76]
Ratos Sprague-Dawley (machos de 4 semanas de idade) com restrição de Mg (150 mg/kg de ração) por longo prazo (2 anos)	Fígado	7.000 genes com funções conhecidas (RGU34A *gene expression probe array*, Affymetrix)	↓ Genes envolvidos no metabolismo energético e respiratório ↓ Genes envolvidos na citoarquitetura hepática ↑ Atp2a2 (transportador de cálcio) e ↓ calreticulina (proteína de estoque de cálcio) ↓ Genes proteolíticos e ↓ DNA topoisomerase ↓ Glutationa transferase (enzima antioxidante) ↑ Ddit3 (induzida por dano ao DNA) e ↑ Bcl-2 (proteína pró-apoptótica)	Martin et al. (2007)[82]

* Expressão aumentada ou diminuída em pelo menos duas vezes quando comparada às amostras controle.

nutrigenéticas/nutrigenômicas desse mineral na manutenção da saúde e na redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis. Com o conhecimento gerado a partir desses estudos, lacunas ainda existentes nos modelos explicativos do metabolismo de magnésio poderão ser preenchidas. Avanços nesse sentido incluem a melhor compreensão de vias de sinalização envolvidas na homeostase celular de magnésio e a identificação de canais e transportadores não só desse mineral, mas também de cálcio e de outros íons que interagem com o seu metabolismo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alberts B, Jonhson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 6.ed. New York: Garland Science; 2015.
2. Wolf F, Cittadini A. Chemistry and biochemistry of magnesium. Mol Aspects Med. 2003;24(1-3):3-9.
3. Fox C, Ramsoomair D, Carter C. Magnesium: its biological significance. South Med J. 2001;94:1195-1201.
4. Barbagallo M, Belvedere M, Dominguez LJ. Magnesium homeostasis and aging. Magnesium Research. 2009;22(9):235-46.
5. Colli C, Sales CH, Rocha VS. Assessment of magnesium status. In: Berhardt LV. Advances in Medicine and Biology. Hauppauge: Nova Science, 2013.
6. Touyz RM. Magnesium in clinical medicine. Frontiers in Bioscience. 2004;9:1278-93.
7. Witkowski M, Hubert J, Mazur A. Methods of assessment of magnesium status in humans: a systematic review. Magnes Res. 2011;24(4):163-80.
8. Yang L, Arora K, Beard WA, Wilson SH, Schlick T. Critical role of magnesium ions in DNA polymerase beta's closing and active site assembly. J Am Chem Soc. 2004;126(27):8441-53.
9. Kao WH, Folsom AR, Nieto FJ, Mo JP, Watson RL, Brancati FL. Serum and dietary magnesium and the risk for type 2 diabetes mellitus: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. Arch Internal Med. 1999;159:2151-59.
10. Ascherio A, Hennekens C, Willett WC, Sacks F, Rosner B, Manson J et al. Prospective study of nutritional factors, blood pressure, and hypertension among US women. Hypertension. 1996; 27:1065-72.

11. Joffres MR, Reed DM, Yano K. Relationship of magnesium intake and other dietary factors to blood pressure: the Honolulu heart study. Am J Clin Nutr. 1987;45:469-75.
12. Romani AMP. Intracellular magnesium homeostasis. In: Vink R, Nechifor M. Magnesium in the Central Nervous System. University of Adelaide Press: South Australia; 2011b.
13. Wolf FI, Torsello A, Fasarella S, Cittadini A. Cell physiology of magnesium. Mol Aspects Med. 2003;24(1-3):11-26.
14. Rocha VS. Status em magnésio na pré-eclâmpsia e sua relação com o estresse oxidativo e a inflamação [tese]. 2014. 86 f. Ciências dos Alimentos – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo; 2014.
15. [IOM] Institute of Medicine. National Research Council. Dietary reference intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D, and fluoride. Washington, DC: National Academy Press; 1999.
16. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: avaliação nutricional da disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil. Rio de Janeiro: IBGE; 2011.
17. FAO/WHO – Expert Consultation on Human Vitamin and Mineral Requirements. Vitamin and mineral in human nutrition: report of a join FAO/WHO expert consulation. Bangkok; 1998.
18. Kelsay JL, Behall KM, Prather ES. Effect of fiber from fruit and vegetables on the metabolic responses of human subjects, II. Calcium, magnesium, iron, and silicon balances. Am J Clin Nutr. 1979;32(9):1876-80.
19. Bei L, Wood RJ, Rosenberg IH. Glucose polymer increases jejunal calcium, magnesium and zinc absorption in humans. American Journal of Clinical Nutrition. 1986;44:244-47.
20. Hsu YJ, Hoenderop JG, Bindels RJ. TRP channels in kidney disease. Biochim Biophys Acta. 2007;1772(8):928-36.
21. Matzkin H, Lotan D, Boichis H. Primary hypomagnesemia with a probable double magnesium transport defect. Nephron. 1989;52(1):83-86.
22. Milla PJ, Aggett PJ, Wolff OH, Harries JT. Studies in primary hypomagnesaemia: evidence for defective carrier-mediated small intestinal transport of magnesium. Gut. 1979;20(11):1028-33.
23. Schmitz C, Perraud AL, Johnson CO, Inabe K, Smith MK, Penner R et al. Regulation of vertebrate cellular Mg^{2+} homeostasis by TRPM7. Cell. 2003;114(2):191-200.
24. Schlingmann KP, Weber S, Peters M, Niemann Nejsum L, Vitzthum H, Klingel K et al. Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family. Nat Genet. 2002;31(2):166-70.
25. Schlingmann KP, Waldegger S, Konrad M, Chubanov V, Gudermann T. TRPM6 and TRPM7—Gatekeepers of human magnesium metabolism. Biochim Biophys Acta. 2007;1772:813-21.
26. Baijj JHF, Hoenderop JGJ, Bindels RJM. Magnesium in man: implication for health and disease. Physiol Rev. 2015;95:1-46.
27. Romani AMP. Cellular magnesium homeostasis. Arch Biochem Biophys. 2011a;512(1):1-23.
28. Yogi A, Callera GE, O'Connor SE, He Y, Correa JW, Tostes RC et al. Dysregulation of renal transient receptor potential melastatin 6/7 but not paracellin-1 in aldosterone-induced hypertension and kidney damage in a model of hereditary hypomagnesemia. J Hypertens. 2011;29(7):1400-10.
29. Pham PC, Pham PA, Pham SV, Pham PT, Pham PM, Pham PT. Hypomagnesemia: a clinical perspective. Int J Nephrol Renovasc Dis. 2014;9(7):219-30.
30. Van Der Wijst J, Hoenderop JG, Bindels RJ. Epithelial Mg^{2+} channel TRPM6: insight into the molecular regulation. Magnes Res. 2009;22(3):127-32.
31. Agus ZS. Hypomagnesemia. J Am Soc Nephr. 1999;10(7):1616-22.
32. Rude RK, Gruber HE, Norton HJ, Wei LY, Frausto A, Kilburn J. Dietary magnesium reduction to 25% of nutrient requirement disrupts bone and mineral metabolism in rat. Bone. 2005;37(2):211-19.
33. Teixeira PDS. Restrição dietética de magnésio em ratos alimentados com rações hiperlipídicas: implicações sobre o status de ferro e a inflamação no tecido adiposo visceral [dissertação]. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo; 2014.
34. Sales CH, Santos AR, Cintra DEC, Colli C. Magnesium-deficient high-fat diet: Effects on adiposity, lipid profile and insulin sensitivity in growing rats. Clin Nutr. 2014;33(5):879-88.
35. Rocha VS, Lavanda I, Nakano EY, Ruano R, Zugaib M, Colli C. Calcium and magnesium status is not impaired in pregnant woman. Nutr Res. 2012;32(7):542-46.
36. Rocha VS, Della Rosa FB, Ruano R, Zugaib M, Colli C. Association between magnesium status, oxidative stress and inflammation in preeclampsia: a case-control study. Clin Nutr. 2014;14(v.S0261-56114):299-94.
37. Sales CH, Nascimento DA, Medeiros ACQ, Lima KC, Pedrosa LFC, Colli C. There is chronic latent magnesium deficiency in apparently healthy university students. Nutr Hosp. 2014;30(1):200-04.
38. De Carli E, Lobo AR, Sale CH, Teixeira PDS, Sales ALCC, Colli C. Short-term dietary magnesium restriction lowers spleen iron concentration in growing rats fed a high-fat diet. LWT- Food Sci Technol. 2014;59(2):1298-1303.
39. Belluci MM, Schoenmakerb T, Rossa-Juniora C, Orricoa SR, Vriesb TJ, Everts V. Magnesium deficiency results in an increased formation of osteoclasts. J Nutr Biochem. 2013;24(8):1488-98.
40. Nielsen FH. Magnesium, inflammation, and obesity in chronic disease. Nutr Rev. 2010;68(6):333-40.
41. Nadler MJ, Hermosura MC, Inabe K, Perraud AL, Zhu Q, Stokes AJ et al. LTRPC7 is a Mg.ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability. Nature. 2001;411(6837):590-95.
42. Simon DB, Lu Y, Choate KA, Velazquez H, Al-Sabban E, Praga M et al. Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg^{2+} resorption. Science. 1999;285(5424):103-06.
43. Hou J, Renigunta A, Gomes AS, Hou M, Paul DL, Waldegger S et al. Claudin-16 and claudin-19 interaction is required for their assembly into tight junctions and for renal reabsorption of magnesium. Proc Natl Acad Sci. 2009;106(36):15350-55.
44. Goytain A, Quamme GA. Identification and characterization of a novel mammalian Mg2+ transporter with channel-like properties. BMC Genomics, 2005;6(48).
45. Zhou H, Clapham DE. Mammalian MagT1 and TUSC3 are required for cellular magnesium uptake and vertebrate embryonic development. Proc Natl Acad Sci. 2009;106(37):15750-55.
46. Sahni J, Nelson B, Scharenberg AM. SLC41A2 encodes a plasma-membrane Mg^{2+} transporter. Biochem J. 2007;401(2):505-13.
47. Goytain A, Hines RM, El-Husseini A, Quamme GA. NIPA1-(SPG6), the basis for autosomal dominant form of hereditary spastic paraplegia, encodes a functional Mg2+ transporter. J Biol Chem. 2007;282(11):8060-68.
48. Goytain A, Quamme GA. Identification and characterization of a novel family of membrane magnesium transporters, MMgT1 and MMgT2. Am J Physiol Cell Physiol. 2008;294(2):C495-502.
49. Kolisek M, Zsurka G, Samaj J, Weghuber J, Schweyen RJ, Schweigel M. Mrs2p is an essential component of the major elec-

trophoretic Mg^{2+} influx system in mitochondria. EMBO J. 2003; 22(6):1235-44.
50. Gunther T, Vormann J, Förster R. Regulation of intracellular magnesium by Mg^{2+} efflux. Biochem Biophys Res Commun. 1984;119(1):124-31.
51. Tashiro M, Konishi M. Na+ gradient-dependent Mg2+ transport in smooth muscle cells of guinea pig tenia cecum. Biophys J. 1997;73(6):3371-84.
52. Cefaratti C, Romani A, Scarpa A. Characterization of two Mg2+ transporters in sealed plasma membrane vesicles from rat liver. Am J Physiol. 1998;275(4pt1):C995-C1008.
53. Kolisek M, Launay P, Beck A, Sponder G, Serafini N, Brenkus M et al. SLC41A1 is a novel mammalian Mg2+ carrier. J Biol Chem. 2008;283(23):16235-47.
54. Nestler A, Rylanderb R, Kolisek M, Nielsen T, Ödmanc N, Vormannb J et al. Blood pressure in pregnancy and magnesium sensitive genes. Pregnancy Hypertension. 2014;4(1):41-45.
55. Nilius B, Owsianik G. The transient receptor potential family of ion channels. Genome Biology. 2011;12(3):218-29.
56. Pedersen SF, Owsianik G, Nilius B. TRP channels: an overview. Cell Calcium. 2005;38(3/4):233-52.
57. Schlingmann KP, Gudermann T. A critical role of TRPM channel-kinase for human magnesium transport. J Physiol. 2005; 566(2):301-08.
58. Voets T, Nilliues B, Hoefs S, Van Der Kemp AW, Droogmans G, Bindels RJ et al. TRPM6 forms the Mg2+ influx channel involved in intestinal and renal Mg^{2+} absorption. J Biol Chem. 2004; 279:19-25.
59. Konrad M, Schlingmann KP. Inherited disorders of renal hypomagnesaemia. Nephrol Dial Transplant. 2014;29(4):IV63-71.
60. Groenestege WM, Hoenderop JG, Van Den Heuvel L, Knoers N, Bindels RJ. The epithelial Mg2+ channel transient receptor potential melastatin 6 is regulated by dietary Mg2+ content and estrogens. J Am Soc Nephrol. 2006;17(4):1035-43.
61. Cao G, van der Wijst J, van der Kemp A, van Zeeland F, Bindels RJ, Hoenderop JG. Regulation of the epithelial Mg2+ channel TRPM6 by estrogen and the associated repressor protein of estrogen receptor activity (REA). J Biol Chem. 2009;284(22):14788-95.
62. Groenestege WM, Thébault S, Van Der Wijst J, Van Den Berg D, Janssen R, Tejpar S et al. Impaired basolateral sorting of pro-EGF causes isolated recessive renal hypomagnesemia. J Clin Invest. 2007;117(8):2260-67.
63. Sahni J, Scharenberg AM. TRPM7 ion channels are required for sustained phosphoinositide 3 kinase signaling in lymphocytes. Cell Metab. 2008;8(1):84-93.
64. Ryazanova LV, Rondon LJ, Zierler S, Hu Z, Galli J, Yamaguchi TP et al. TRPM7 is essential for Mg(2+) homeostasis in mammals. Nat Commun. 2010;1:109.
65. Nikonorova IA, Kornakov NV, Dmitriev SE, Vassilenko KS, Ryazanov AG. Identification of a Mg2+-sensitive ORF in the 5'-leader of TRPM7 magnesium channel mRNA. Nucleic Acids Res. 2014;42(20):12779-88.
66. Runnels LW, Yue L, Clapham DE. TheTRPM7 channel is inactivated by PIP2 hydrolysis. Nat Cell Biol. 2002;4(5):329-36.
67. Kausalya PJ, Amasheh S, Günzel D, Wurps H, Müller D, Fromm M et al. Disease-associated mutations affect intracellular traffic and paracellular Mg2+ transport function of Claudin-16. J Clin Invest. 2006;116(4):878-91.
68. Knoers NVAM, Levtchenko EN. Gitelman syndrome. Orphan et Journal of Rare Diseases. 2008;3(22):1-6.
69. Meyer TE, Verwoert GC, Hwang SJ, Glazer NL, Smith AV, van Rooij VA et al. Genome-wide association studies of serum magnesium, potassium, and sodium concentrations identify six loci influencing serum magnesium levels. PloS Genetics. 2010;6(8): e1001045.
70. Hruby A, Ngwa JS, Renström F, Wojczynski MK, Ganna A, Hallmans G et al. Higher magnesium intake is associated with lower fasting glucose and insulin, with no evidence of interaction with select genetic loci, in a meta-analysis of 15 CHARGE Consortium Studies. J Nutr. 2013b;143(3):345-53.
71. Song Y, Hsu YH, Niu T, Manson JE, Buring JE, Liu S. Common genetic variants of the ion channel transient receptor potential membrane melastatin 6 and 7 (TRPM6 and TRPM7), magnesium intake, and risk of type 2 diabetes in women. BMC Med Genet. 2009;10(4).
72. Nair AV, Hocher B, Verkaart S, Van Zeeland F, Pfab T, Slowinski T et al. Loss of insulin-induced activation of TRPM6 magnesium channels results in impaired glucose tolerance during pregnancy. Proc Natl Acad Sci. 2012;109(28):11324-29.
73. Hruby A, McKeown NM, Song Y, Djoussé L. Dietary magnesium and genetic interactions in diabetes and related risk factors: a brief overview of current knowledge. Nutrients. 2013a;5(12):4990-5011.
74. Sales CH, Pedrosa LF, Lima JG, Lemos TM, Colli C. Influence of magnesium status and magnesium intake on the blood glucose control in patients with type 2 diabetes. Clin Nutr. 2011; 30(3):359-64.
75. Graham, RD. Micronutrient deficiencies in crops and their global significance. In: Alloway, BJ. (Ed.) Micronutrient Deficiencies in Global Crop Production. Heidelberg: Springer; 2007.
76. Ozgo M, Bayle D, Zimowska W, Mazur A. Effect of a low magnesium diet on magnesium status and gene expression in the kidneys of mice selected for high and low magnesium erythrocyte levels. Magnes Res. 2007;20(2):148-53.
77. Petrault I, Zimowska W, Mathieu J, Bayle D, Rock E, Favier A et al. Changes in gene expression in rat thymocytes identified by cDNA array support the occurrence of oxidative stress in early magnesium deficiency. Biochim Biophys Acta. 2002;1586(1):92-98.
78. Vernet P, Britan A, Gueux E, Mazur A, Drevet JR. Dietary magnesium depletion does not promote oxidative stress but targets apical cells within the mouse caput epididymidis. Biochim Biophys Acta. 2004;1675(1-3):32-45.
79. Sabbagh F, Lecerf F, Maurois P, Bac P, German-Fattal M. Severe Mg-deficiency is not associated with endothelial cell activation in mouse lung. Magnes Res. 2005;18(4):225-34
80. Nasulewicz A, Zimowska W, Bayle D, Dzimira S, Madej J, Rayssiguier Y, Opolski A, Mazur A. Changes in gene expression in the lungs of Mg-deficient mice are related to an inflammatory process. Magnes Res. 2004;17(4):259-63.
81. Zimowska W, Girardeau JP, Kuryszko J, Bayle D, Rayssiguier Y, Mazur A. Morphological and immune response alterations in the intestinal mucosa of the mouse after short periods on a low-magnesium diet. Br J Nutr. 2002;88(5):515-22
82. Martin H, Staedtler F, Lamboley C, Adrian M, Schumacher MM, Chibout SD, Laurant P, Richert L, Berthelot A. Effects of long-term dietary intake of magnesium on rat liver transcriptome. Magnes Res. 2007;20(4):259-65.
83. Chacko SA, Sul J, Song Y, Li X, LeBlanc J, You Y, Butch A, Liu S. Magnesium supplementation, metabolic and inflammatory markers, and global genomic and proteomic profiling: a randomized, double-blind, controlled, crossover trial in overweight individuals. Am J Clin Nutr. 2011 Feb;93(2):463-73.

18 Polifenóis

Neuza Mariko Aymoto Hassimotto
Franco Maria Lajolo

INTRODUÇÃO

Sabe-se que os hábitos alimentares inadequados e o sedentarismo estão relacionados ao aumento do risco do desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como as cardiovasculares, o diabete melito tipo 2 (DM2), o câncer, entre outras, e que a adesão a determinados padrões alimentares reduz o risco de incidência dessas doenças.[1, 2] Estudos epidemiológicos revelam correlações positivas entre alimentação rica em frutas e hortaliças e aspectos benéficos à saúde. Essa relação tem sido atribuída ao fato de esses alimentos apresentarem, além dos nutrientes essenciais, compostos bioativos de alimentos (CBA) de natureza química diversa, os quais têm ações biológicas importantes, atuando por meio da modulação de eventos moleculares e vias de sinalização celular.[3]

Dentre os diversos CBA encontrados na natureza, destacam-se os polifenóis, que têm sido objeto de pesquisas em todo o mundo. Tais pesquisas evidenciam o seu potencial de redução do risco de DCNT em razão de seus efeitos múltiplos, como os anti-inflamatórios, antioxidantes, vasodilatadores, quimiopreventivos e neuroprotetores.[3-6] Esses benefícios podem ser atribuídos tanto a mecanismos não específicos relacionados à capacidade antioxidante, que incluem a captura ou o sequestro de espécies reativas de oxigênio (ERO), quanto aos mecanismos específicos, que envolvem interações com proteínas celulares essenciais em determinadas vias metabólicas.[3-5]

Estudos *in vitro* evidenciam que os polifenóis apresentam a capacidade de modular a expressão gênica e a atividade de enzimas, de receptores nucleares e de fatores de transcrição, podendo influenciar vias de sinalização celular que regulam eventos complexos, como a resposta inflamatória.[3, 7] A ação anti-inflamatória de alguns polifenóis é baseada em mecanismos importantes, os quais ilustram a abrangência de suas ações em relação à saúde.

A inflamação é um processo complexo que envolve diversas vias de sinalização celular, ativação/inibição de fatores de transcrição e aumento da expressão de proteínas com ação pró-inflamatória. Os polifenóis atuam em vários alvos moleculares envolvidos na cascata de sinalização da inflamação, o que resulta na modulação da expressão de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF-alfa) e a interleucina-1 (IL-1beta).[7-9]

O estudo de mecanismos complexos, envolvendo dezenas de alvos moleculares, foi beneficiado nos últimos anos pelo desenvolvimento e aplicação das tecnologias ômicas e pelo conceito de biologia de sistemas, que são aplicados à genômica nutricional.[10-12] A transcriptômica, a proteômica, a metabolômica e a bioinformática permitem analisar, em fluidos, tecidos ou órgãos, milhares de proteínas e metabólitos simultaneamente e, assim, descobrir alvos moleculares dos CBA e suas consequentes ações no metabolismo. Estudos metagenômicos aplicados ao microbioma intestinal, por exemplo, permitem descobrir a interação recíproca entre microbioma e polifenóis, inferir sobre a biotransformação e identificar os derivados desses compostos que realmente chegam às células, facilitando a compreensão dos mecanismos envolvidos e a instituição de intervenções nutricionais personalizadas.[11-13]

Neste capítulo, serão discutidas as ações dos polifenóis, particularmente dos flavonoides, na expressão gênica em diferentes tecidos e condições, tendo como foco sua ação antioxidante e anti-inflamatória. Será também explorada sua ação em mecanismos epigenéticos e como esses mecanismos explicam a sua atuação na promoção da saúde.

ESTRUTURA QUÍMICA E INGESTÃO DE FLAVONOIDES

Os polifenóis são metabólitos secundários constituintes de plantas superiores, encontrados em enorme variedade de alimentos de origem vegetal, como frutas, hortaliças e cereais, além de estarem presentes em bebidas preparadas com matérias-primas vegetais, como café, chás e vinho.

Os polifenóis podem variar de moléculas simples a polímeros de alto peso molecular e podem ser agrupados de acordo com a estrutura química básica em diferentes grandes classes: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos e taninos.[3]

Os flavonoides possuem estrutura básica de quinze carbonos no seu núcleo fundamental (C6–C3–C6), composto por dois anéis aromáticos (anel A e B) unidos por uma cadeia linear de três carbonos que podem formar um anel heterocíclico (anel C) (Figura 18.1). O anel A é formado a partir da condensação de três unidades de acetato, enquanto o anel B e os três carbonos do anel central constituem uma unidade fenilpropanoide a partir do *p*-cumaroil-CoA.[14]

Dependendo da oxidação do anel central C e da posição do anel B, os flavonoides são classificados em diversas subclasses. As principais subclasses de flavonoides presentes na alimentação são os flavonóis, as flavonas, os flavanóis (ou flavan-3-óis), as antocianidinas, as flavanonas, as isoflavonas e as chalconas (Figura 18.1). Na maioria dos flavonoides, o anel B está ligado na posição 2 do anel C; contudo, em alguns casos, o anel B pode estar ligado na posição 3 do anel C, como ocorre com as isoflavonas. Os compostos individuais dentro de cada subclasse são diferenciados pelo número e posição de hidroxilas e metoxilas presentes nos dois anéis aromáticos.[14]

Dentre as classes de flavonoides, os flavonóis são os mais difundidos nas plantas. Os principais representantes na alimentação são a quercetina, o caenferol, a isoramnetina e a miricetina. Já as flavanonas são comuns em frutas cítricas e incluem a naringenina, presente na toranja, e a hesperidina, na laranja. As antocianidinas, em pH ácido, apresentam-se na forma protonada denominada *cátion flavilium* e conferem pigmentação a diversas frutas e hortaliças, como morango, mirtilo, amora-preta, cebola roxa e berinjela, entre outras. Os flavanóis podem ser encontrados livres como a (+)-catequina e (-)-epicatequina nas uvas, ou esterificados ao ácido gálico, como a (-)-epigalocatequina-3-*O*-galato,

Esqueleto de flavonoides

Flavonol · Flavona · Flavanol · Antocianidina

Flavanona · Isoflavona · Chalcona

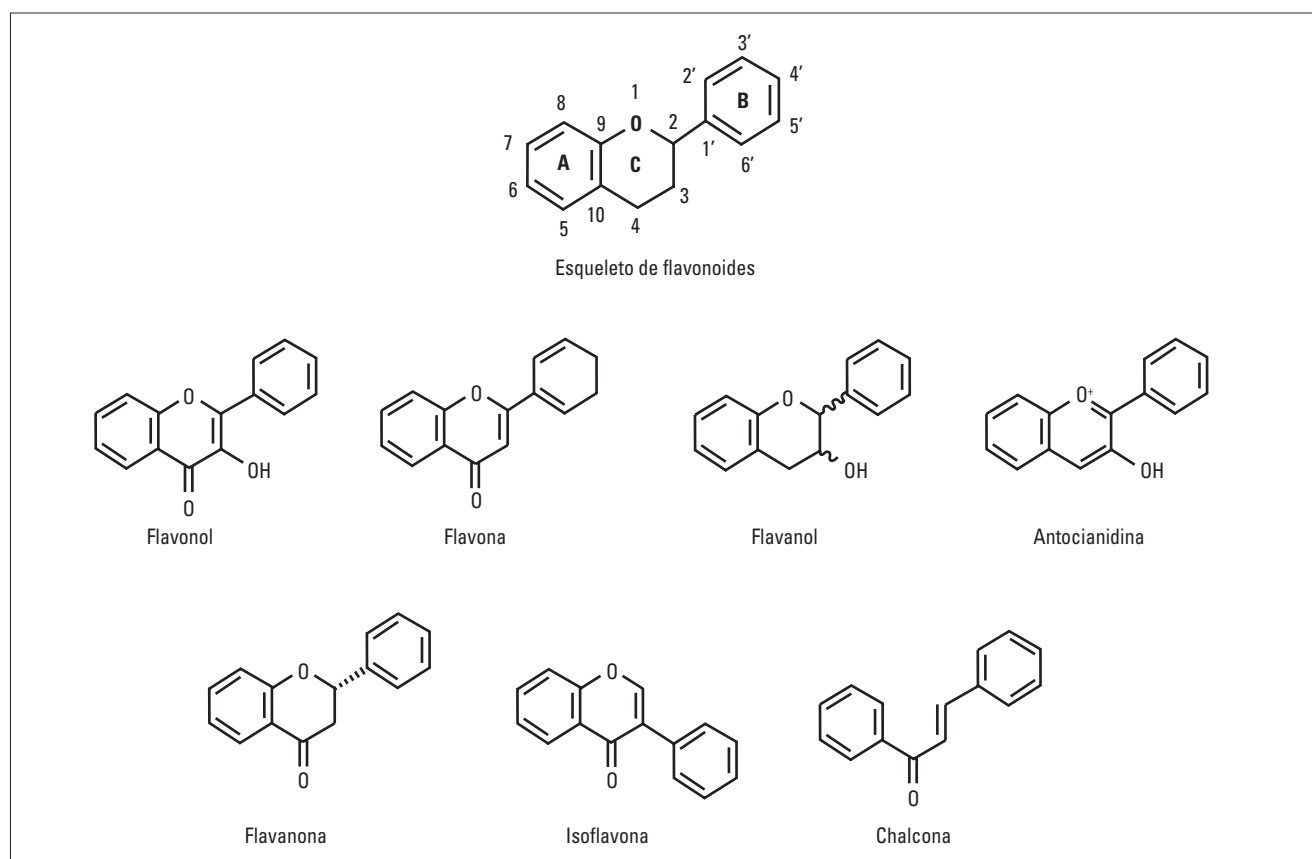



Figura 18.1 Estrutura básica de flavonoides e as principais classes encontradas em alimentos. **Fonte:** adaptada de Crozier et al.[14]

predominante nas folhas de *Camellia sinensis*, matéria-prima do chá-verde. As catequinas podem, ainda, formar estruturas complexas como as proantocianidinas oligoméricas e poliméricas, presentes no chocolate.[15-17]

Os flavonoides podem ocorrer como agliconas ou ligados a moléculas de carboidratos (forma glicosilada). Os flavonoides glicosilados mais comuns são os *O*-glicosídeos, nos quais um ou mais grupos hidroxila estão ligados a um ou mais açúcares por uma ligação hemicetal, os quais algumas vezes estão ligados a grupos acila. Entretanto, podem ser encontrados como *C*-glicosídeos quando os açúcares estão ligados diretamente à estrutura (Figura 18.2). Frequentemente, os açúcares conjugados aos flavonoides são a D-glicose e a rutinose, mas outros açúcares também podem estar presentes, como a galactose, a xilose e a arabinose. A conjugação geralmente ocorre na posição 3 do anel C, podendo também ocorrer nas posições C-5, C-7, C-3, C-4' e C-5'.[3]

A estimativa de ingestão diária dos flavonoides é bastante variada, de acordo com as diferentes características regionais. No Reino Unido, a ingestão de flavonoides foi estimada entre 103 e 210 mg/dia, com contribuição principal dos flavanóis (58 a 64 mg/dia), das flavononas (22 a 89 mg/dia) e dos flavonóis (26 a 35 mg/dia). Já nos Estados Unidos, estima-se uma ingestão de aproximadamente 1 g/dia, representada pela ingestão de flavononas, flavonóis, flavonas (160 a 175 mg/dia), antocianinas (180 a 215 mg/dia) e catequinas (220 mg/dia).[18] No Brasil, estima-se a ingestão de 60 a 106 mg/dia de flavonoides, caracterizada principalmente pelas flavanonas.[19]

MODULAÇÃO DA CASCATA DE SINALIZAÇÃO DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES E DE DESTOXIFICAÇÃO

Estresse oxidativo e atividade antioxidante

As ERO e as espécies reativas de nitrogênio (ERN) atuam como importantes sinalizadores no controle da homeostase redox celular, exercendo função na defesa contra patógenos e modulando diversos processos biológicos, como a sinalização celular, a resposta inflamatória, a apoptose e a proliferação celular. Entretanto, quando ocorre o desequilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes, há acúmulo de ERO e ERN, o que caracteriza o estresse oxidativo.[20] Tal situação resulta em danos a biomoléculas e em alteração na sinalização celular, contribuindo para o desenvolvimento de condições fisiopatológicas como câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas.[21, 22]

Quercetina-3-*O*-glucosídeo

Hesperetina-7-*O*-rutinosídeo

Malvidina-3-*O*-(6''-*O*-*p*-cumaroil)-glucosídeo

Luteolina-8-*C*-glucosídeo

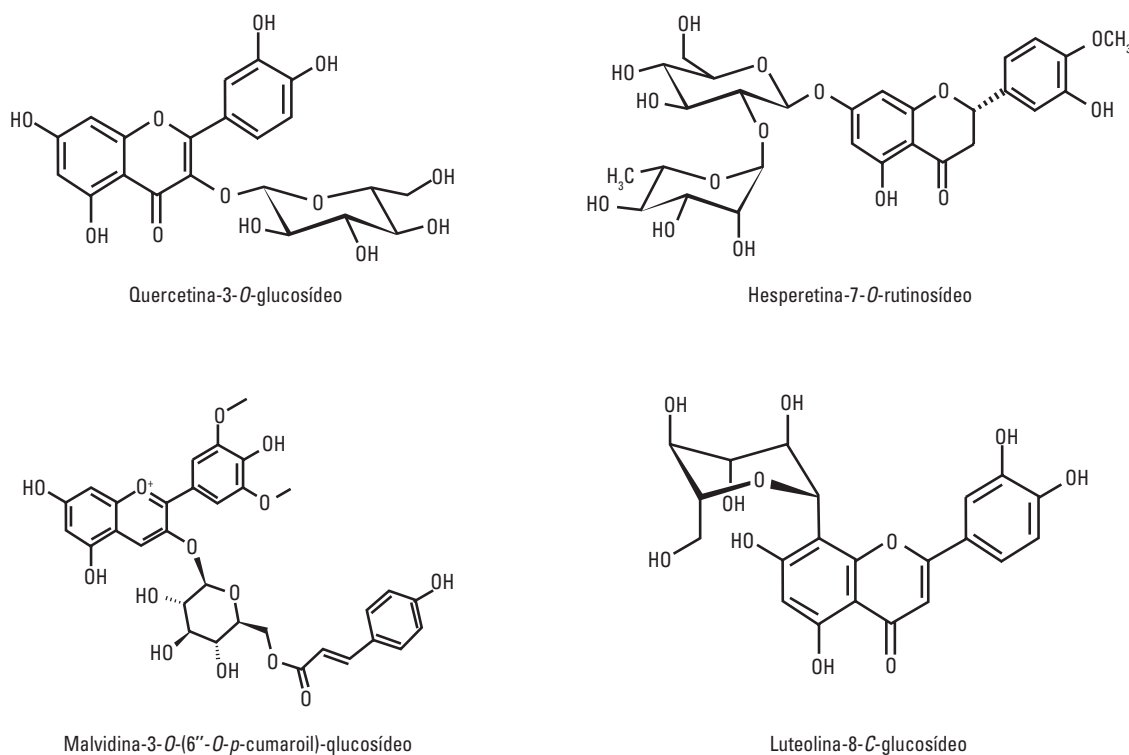



Figura 18.2 Flavonoides *O*-glicosídeos e *C*-glicosídeos.

Nesse sentido, compostos com capacidade antioxidante podem exercer efeitos protetores contra DCNT. Entende-se por mecanismos antioxidantes de ação direta aqueles relacionados à ação de sequestro e/ou neutralização de ERO e ERN, exercidos pelos compostos antioxidantes endógenos e exógenos. Dentre os antioxidantes endógenos mais relevantes, pode-se citar:

- A glutationa (GSH), um tripeptídeo formado pelos aminoácidos ácido glutâmico, cisteína e glicina, presente nas células em concentrações milimolares. A GSH é importante na manutenção da homeostase redox, neutralizando diversas ERO, dentre as quais os radicais superóxido ($O_2^{\bullet}$) e hidroxila ($OH^{\bullet}$), e as ERN, como óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) e peroxinitrito ($ONOO^-$).
- A bilirrubina, produto final do catabolismo do heme. Sugere-se que diferentes formas circulantes da bilirrubina teriam a capacidade de remover ERO, inibindo a oxidação do colesterol de lipoproteínas de baixa densidade (LDL).
- As proteínas de transporte, como transferrina, lactoferrina e albumina, as quais atuam como potentes quelantes de metais e de radicais livres.
- O urato, produto final do catabolismo das purinas a partir da ação da xantina oxidase, um potente antioxidante presente em células e fluidos biológicos.[23, 24]

Além destes, o organismo pode ainda ter o auxílio dos antioxidantes exógenos, obtidos a partir da alimentação, com destaque para os antioxidantes lipofílicos (como alfa-tocoferol) e os hidrofílicos (como vitamina C), além de CBA, como os polifenóis.[23]

Os polifenóis são conhecidos por serem potentes agentes antioxidantes,[25] sendo essa propriedade um dos mecanismos propostos de proteção contra o excesso de ERO e ERN. Assim, os polifenóis podem ter ação direta sobre os radicais livres, como o ânion superóxido, os radicais hidroxila, a alcoxila e a peroxila, neutralizando-os e diminuindo a ação deletéria destes sobre as macromoléculas.

Muitos alimentos de origem vegetal que contêm alto teor de polifenóis apresentam capacidade antioxidante elevada quando avaliada por métodos *in vitro*; entretanto, a significância biológica desses resultados ainda não é clara, uma vez que tais modelos experimentais não consideram a biodisponibilidade desses compostos. A avaliação de diversos estudos clínicos com humanos indica que, após a ingestão de polifenóis por meio de alimentos e de bebidas, ou na forma isolada, em dose única, ocorre aumento do potencial antioxidante plasmático entre 5 e 30%, em decorrência da absorção e presença desses CBA. Por outro lado, na maioria dos estudos envolvendo a ingestão repetida de alimentos – geralmente uma porção/dia, durante uma a três semanas –, não se observou aumento da capacidade antioxidante plasmática.[25]

Entretanto, a maior parte da defesa antioxidante do organismo é representada por um sistema de enzimas antioxidantes. Os polifenóis podem aumentar a proteção antioxidante de maneira indireta, modulando a expressão de enzimas antioxidantes e de destoxificação (de fase II), por meio da via de sinalização Keap1-Nrf2-ARE (*Kelch-Like ECH-Associated Protein 1 - Nuclear factor [erythroid-derived 2]-like 2 – antioxidant response element*). Essa via é dependente do potencial redox da célula, o qual modula de maneira positiva a expressão de diversas enzimas de destoxificação, dentre as quais a NAD(P)H:quinona oxirredutase 1 (NQO1), a glutationa S-transferase (GST), a gama-glutamato cisteína ligase (gama-GCLC e gama-GCLM) e a heme-oxigenase-1 (HO-1), as quais contribuem indiretamente para a redução das concentrações de potenciais oxidantes. Essa via de sinalização também se relaciona à expressão de enzimas antioxidantes, como a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD), a glutationa peroxidase (GPx) e o sistema enzimático tiorredoxina, enzimas que atuam diretamente sobre os agentes oxidantes, neutralizando-os.[24,26]

A HO-1 é a enzima limitante do catabolismo do heme em monóxido de carbono, biliverdina e ferro, com grande produção de superóxidos e outras ERO nesse processo. As principais classes dessas proteínas são a hemoglobina, as oxidases (como NADPH oxidase não mitocondrial, ciclo-oxigenase, succinato desidrogenase e citocromo c oxidase), além das peroxidases. Já a NQO1 catalisa a redução da quinona para a hidroquinona, na presença de NADH ou NADPH, prevenindo a formação de radicais livres a partir da ubiquinona.[23]

O sistema enzimático tiorredoxina é fundamental na defesa antioxidante. Ele reduz pontes dissulfeto de diversas proteínas e remove o peróxido de hidrogênio ou outros peróxidos por meio do NADPH como doador de elétrons. Esse sistema compreende as proteínas tiorredoxina, tiorredoxina redutase, peroxirredoxinas e sulfirredoxina.[23] A SOD catalisa a neutralização do radical superóxido com a formação de peróxido de hidrogênio, o qual pode subsequentemente ser neutralizado pela ação da CAT, da GPx ou de outro sistema antioxidante. A GPx faz parte do sistema antioxidante que compreende a GSH e as enzimas glutationa redutase (GR) e glutationa-S-transferase (GST) (Figura 18.3), todas reguladas pela via Keap1-Nrf2-ARE, com importante papel na redução de peróxido de hidrogênio e lipídios oxidados.[23]

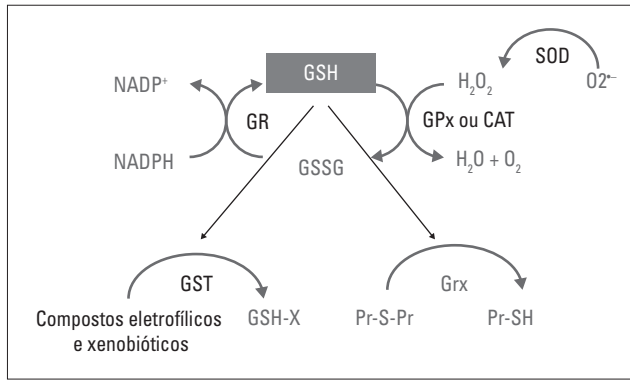



Figura 18.3 Mecanismo de ação do sistema glutationa. CAT: catalase; GPx: glutationa peroxidase; GR: glutationa redutase; Grx: glutarredoxina; GSH: glutationa reduzida; GSH-X: GSH ligada à xenobiótico; GST: glutationa-S-transferase; GSSG: glutationa oxidada; NADP: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato; NADPH: NADP reduzida; Pr-S-Pr: proteínas siladas por enxofre; Pr-SH: proteína tiol; SOD: superóxido dismutase. **Fonte:** adaptada de Zhang et al.[23]

Via de sinalização Keap1-Nrf2-ARE

A via Keap1-Nrf2-ARE é um sistema de sinalização integrado que regula a expressão de 1 a 10% dos genes humanos.[27] O Nrf2 (fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2) é um fator de transcrição que permanece no citoplasma em condições fisiológicas normais, na forma inativa, ligado a uma proteína denominada Keap1, a qual é sensível a alterações promovidas por ERO e compostos eletrofílicos. A Keap1 se liga fortemente ao Nrf2, ancorando-o no citoplasma próximo ao sistema proteassoma.[21, 28]

Sob condições basais, duas proteínas Keap1 formam um homodímero que se liga ao Nrf2 por meio de dois sítios de reconhecimento (DLG e ETGE) com diferentes afinidades. A proteína Keap1 também está ligada à culina 3 (Cul3), a qual mantém associação com o Nrf2 e medeia sua poliubiquitinação. Na forma de complexo Nrf2-Keap1-Cul3, o Nrf2 é constantemente ubiquitinado pelo complexo Keap1-Cul3 ligase e degradado pelo sistema proteassoma 26S ($t_{1/2}$ <20 min). Sob condições de estresse oxidativo, a Keap1 sofre oxidação ou modificação covalente dos resíduos de cisteína, formando ligações dissulfeto intramoleculares,[21] o que acarreta alteração conformacional do complexo. Essa desnaturação dissocia a interação com o sítio de reconhecimento DLG do Nrf2, afetando a ubiquitinação, uma vez que, sob essas condições, a conformação do Nrf2 não é adequada para ubiquitinação via Keap1-Cul3 ligase, aumentando assim o $t_{1/2}$ para > 200 minutos. Pode ocorrer a dissociação do complexo Keap1-Cul3 também pela modificação do resíduo de cisteína, a qual previne a ubiquitinação e a subsequente degradação proteassomal.[21]

Na presença de estímulos oxidantes ou de ERO, ocorrem modificações covalentes com consequente liberação do Nrf2.[26] Uma vez ativado, o Nrf2 se transloca para o núcleo e se liga à proteína *small Maf (sMaf)*, formando um heterodímero (Nrf2-sMaf). Esse complexo modula a expressão de diversos genes que codificam enzimas antioxidantes ao se ligar ao elemento de resposta antioxidante/elemento de resposta eletrofílica (ARE/EpRE).[21, 28, 29]

A fosforilação do Nrf2 é outro mecanismo que regula a sua afinidade pela Keap1 e a posterior translocação para o núcleo, com consequente indução da expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes e de destoxificação. Algumas quinases, como a proteína quinase C (PKC) e a fosfatidil inositol 3 quinase (PI3K), promovem a dissociação do complexo Nrf2-Keap1-Cul3, provocando a sua translocação nuclear (Figura 18.4). Outras quinases, como as proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) – dentre as quais as quinases reguladas por sinal extracelular (ERK), as quinases c-Jun amino-terminal (JNK) e a proteína p38 (p38) –, apresentam diferentes papéis na fosforilação do Nrf2, dependendo do tipo celular.[23, 26] Outros mecanismos de ativação do complexo Nrf2-Keap1-Cul3 incluem a fosforilação da Keap1 e o estresse do retículo endoplasmático, resultando em fosforilação direta do Nrf2. Essas vias podem ocorrer concomitantemente ou em sequência, porém diferentes tecidos ou células podem apresentar mecanismos e vias de sinalização distintos.[30]

O sistema de sinalização Keap1-Nrf2-ARE pode ser controlado por CBA em três níveis:

- Na ligação entre Nrf2-Keap1 e subsequente degradação proteica no citosol da Keap1.
- Na translocação do Nrf2 do citosol para o núcleo.
- Na interação do Nrf2 com os vários correguladores nucleares e na transativação dos genes que apresentam o ARE na porção regulatória.

Os CBA, incluindo os polifenóis, atuam predominantemente nos dois primeiros níveis.[26]

Atuação de flavonoides na via de sinalização Keap1-Nrf2-ARE

As catequinas pertencem à classe dos flavonoides e são normalmente encontradas como monômeros de catequina (Figura 18.5, D) e seu isômero, a epicatequina, comum no cacau e no vinho. Os monômeros podem, ainda, se apresentar esterificados ao ácido gálico, originando a epigalocatequina, a epicatequina galato e a epigalocatequina galato (EGCG) (Figura 18.5, E), esta última majoritariamente no chá-verde (*Camelia sinensis*). As catequinas são reconhecidamente potentes antioxidantes diretos que atuam na redução das concentrações de ERO

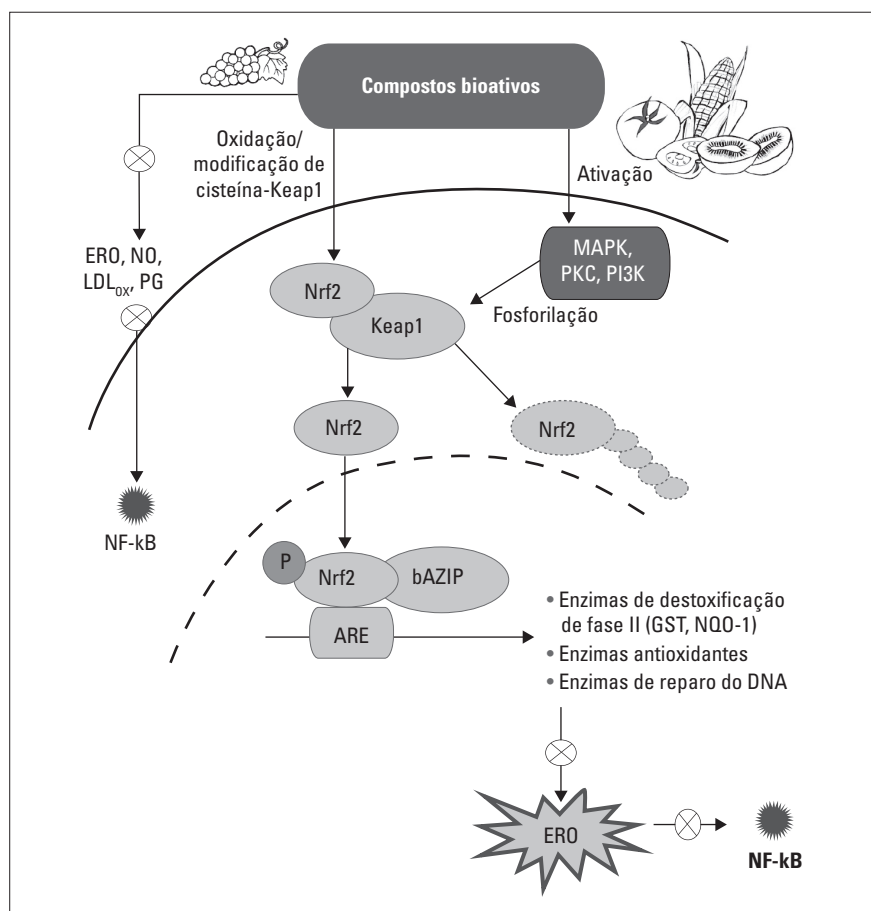



Figura 18.4 Ativação da transcrição de genes relacionados à defesa antioxidante, por meio da ligação do fator nuclear Nrf2 ao elemento de resposta antioxidante (ARE). bAZIP: *basic region-leucine zipper*; ERO: espécies reativas de oxigênio; GST: glutationa S-transferase; Keap1: *kelch-like ECH-associated protein 1*; LDL_{ox}: lipoproteína de baixa densidade oxidada; MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno; NF-kB: fator nuclear kappa B; Nrf2: *Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*; NO: óxido nítrico; NQO-1: NAD(P)H:quinona oxiredutase; PG: prostaglandinas; PI3K: fosfatidilinositol 3-quinase; PKC: proteína quinase C. **Fonte:** adaptada de Cardozo et al.[31] e Tan et al.[26]

e de ERN.[14] Tanto extratos fenólicos de chá-verde quanto a EGCG isolada modulam as defesas antioxidantes por meio da ativação da via de sinalização Keap1-Nrf2-ARE, tanto em modelo animal quanto em cultura de células.[31]

A EGCG pode regular a expressão de enzimas antioxidantes e de destoxificação por dois mecanismos relacionados à modulação da via Keap1-Nrf2-ARE. O primeiro e mais aceito envolve a forma oxidada da EGCG, a qual pode se conjugar a GSH, reduzindo sua concentração celular e acarretando alteração do estado redox celular. Esse estado de estresse oxidativo pode ativar as vias dependentes de quinases (como MAPK, Akt e p38), o que culmina na fosforilação dos resíduos de serina/treonina do Nrf2 e sua liberação do complexo Nrf2-Keap1-Cul3, possibilitando sua translocação para o núcleo. O segundo mecanismo envolve algumas formas reativas da EGCG, as quais podem promover a oxidação dos resíduos de cisteína da proteína Keap1, facilitando a dissociação do Nrf2 do complexo Nrf2-Keap1-Cul3.[31, 32]

Uma vez que a ação moduladora da EGCG sobre a via Keap1-Nrf2-ARE está relacionada à sua forma oxidada, esta pode apresentar efeito pró-oxidante e, portanto, ser deletéria. Tal efeito foi observado, por exemplo, em ratos suplementados com altas doses de EGCG (75 mg/kg de peso corporal), em que ocorreu redução na expressão e na atividade das enzimas SOD, CAT e GPx. Por outro lado, em resposta a tal estímulo, observou-se aumento na expressão e na atividade de outras enzimas moduladas pela via Nrf2-ARE, entre elas a HO-1, a GST, a NQO-1, a GST e a tiorredoxina.[33, 34] Observou-se, ainda, a indução de HO-1 pela EGCG em células endoteliais. A dualidade da EGCG na resposta à ativação dos genes modulados pelo Nrf2-ARE aparentemente é dose dependente, ou seja, observou-se redução na expressão da HO-1 em altas concentrações (> 200 μM) e aumento em concentrações menores (< 50 μM),[35] denotando, desta forma, tanto atividade antioxidante como pró- -oxidante.

Outros flavonoides também podem modular a via de sinalização Keap1-Nrf2-ARE. A genisteína (Figura 18.5, B), conhecida como fitoestrógeno presente na soja, foi capaz de aumentar a expressão e a atividade hepática da NQO1, após administração crônica a ratos.[36] Contudo, em cultura de células pulmonares humanas, o extrato de chá-verde e o extrato de broto de brócolis somente induziram a expressão do RNAm das enzimas de fase II, a GST e a NQO1.[37]

Além de modular a expressão de genes pela via do Keap1-Nrf2-ARE, alguns flavonoides também podem

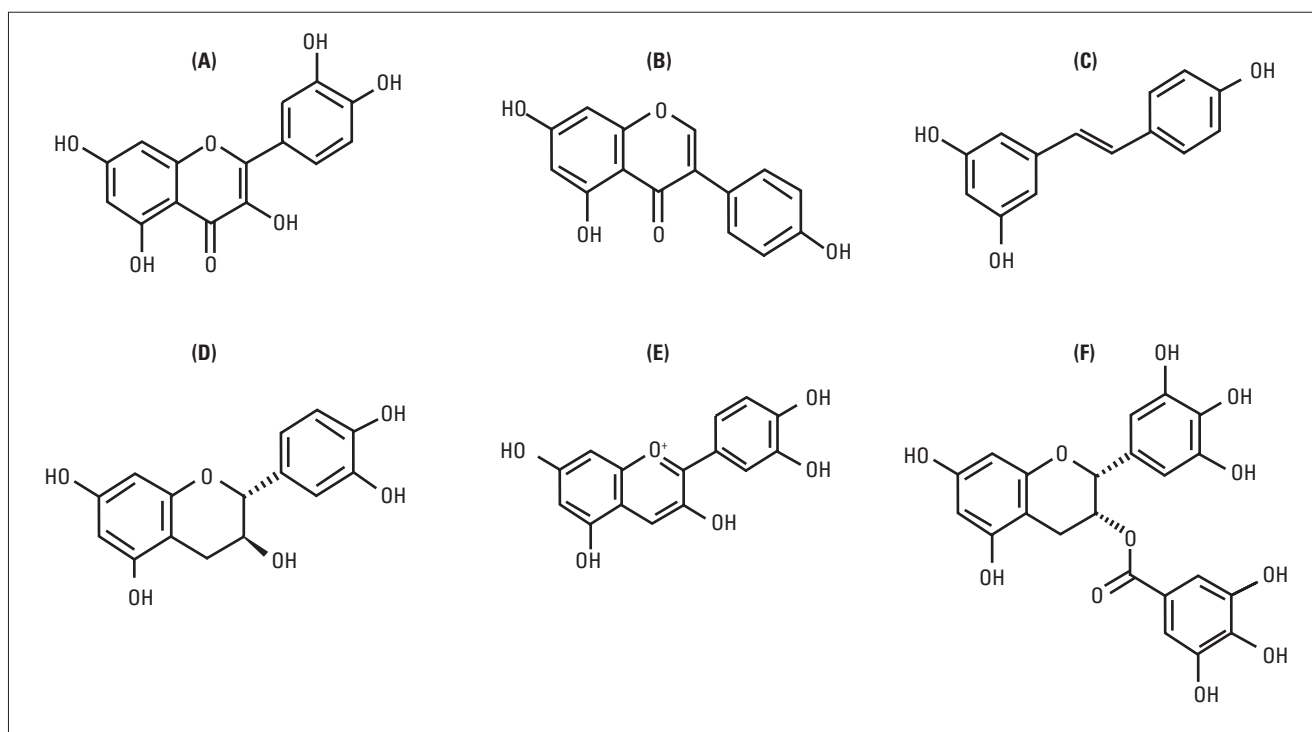



Figura 18.5 Compostos fenólicos com ação sobre a via de sinalização Keap1-Nrf2-ARE. A: quercetina; B: genisteína; C: resveratrol; D: catequina; E: epigalocatequina galato; F: cianidina.

aumentar especificamente a expressão da proteína Nrf2. Em cultura de células de hepatoblastoma, a quercetina (Figura 18.2), um dos principais e mais abundantes flavonoides da alimentação, aumentou a expressão do RNAm e da proteína Nrf2, além de reduzir a concentração da proteína Keap1 em nível pós-traducional por meio da formação de uma proteína modificada, o que pode também ter contribuído para o aumento da transcrição da NQO1.[38] O mesmo foi observado para a EGCG em cultura de células e em modelo animal, nos quais concentrações < 25 mM se mostraram efetivas em modular as defesas antioxidantes por meio de aumento da expressão do Nrf2.[32]

Extrato rico em antocianinas, polifenol pertencente à classe dos flavonoides, obtido de batata-doce roxa, apresentou efeito hepatoprotetor em ratos com fibrose hepática induzida pela dimetilnitrosamina. O extrato de antocianina, nas doses de 50, 100 e 200 mg de extrato/kg de peso corporal, administrado via gavagem, durante quatro semanas, foi capaz de aumentar a expressão das proteínas Nrf2, NQO1, HO-1 e GSH, as quais estavam reduzidas pelo tratamento com a dimetilnitrosamina.[39]

O resveratrol (Figura 18.5, C), flavonoide presente em uvas e vinhos, normalizou a expressão renal de Nrf2 e aumentou a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx, GST e GR em ratos com diabete induzido por estreptozotocina. A dose administrada oralmente em suspenção aquosa foi de 5 mg de resveratrol/kg de peso corporal durante 30 dias.[40]

Entre outros polifenóis capazes de induzir a expressão de genes regulados pelo Nrf2 estão o ácido cafeico fenetil éster, presente no mel; a curcumina, encontrada no açafrão-da-índia;[41] e os ácidos fenólicos presentes no café. Além desses, outros compostos não polifenóis, como o sulforafano derivado de glicosinolatos presentes no brócolis, o licopeno presente no tomate, a alicina do alho e a vitamina E de óleos vegetais, também são capazes de induzir a expressão dos genes regulados pelo Nrf2.[31]

MODULAÇÃO DA CASCATA DE SINALIZAÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO: VIA DE SINALIZAÇÃO DO NF-KB

A inflamação é uma resposta do sistema imune inato a uma lesão ou infecção por patógenos. Entretanto, há evidências circunstanciais de que o estímulo recorrente ou uma deficiência na regulação dessa via podem acarretar inflamação crônica e sistêmica que, associada a outros fatores metabólicos, pode contribuir para o desenvolvimento e o agravamento de DCNT, dentre as quais as doenças cardiovasculares, o diabete melito tipo 2 e o câncer.[42] Assim, diversas linhas de pesquisa focam na sinalização molecular da inflamação e nos CBA que possam modulá-la.[42-47]

Uma das principais vias de sinalização envolvidas no processo inflamatório é a do fator nuclear kappa B (NF-kB). Esse fator de transcrição modula a expressão de

diversos genes relacionados ao processo inflamatório, a proliferação e diferenciação celular, e a apoptose. O NF-kB se encontra no citoplasma como um dímero (p50 e p65), na forma inativa, ligada ao seu inibidor IkB (inibidor de kappa B), formando o complexo NF-kB-IkB. A ativação das diversas vias de sinalização promove a fosforilação do IkB por quinases, o que desfaz o complexo, com posterior ubiquitinação e degradação proteassomal do inibidor. O NF-kB é então translocado para o núcleo, onde modula a expressão de diversos genes que codificam enzimas e citocinas com ação pró-inflamatória.[22] A geração de mediadores químicos liberados pelas células do sistema imune, como as interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) e o TNF-alfa; as quimiocinas e as ERO, em resposta à lesão do tecido; ou, ainda, a interação de lipopolissacarídeos (LPS) com receptores de membrana do tipo *Toll* 4 (TLR4) podem ativar várias vias de sinalização e amplificar a resposta ao estímulo inicial. Além desses estímulos, a via do NF-kB também pode ser ativada por vias de sinalização moduladas pelo potencial redox da célula, dentre as quais a via MAPK.[22]

Observou-se que o NF-kB é constitutivamente ativado em diversos tumores e apresenta papel fundamental como modulador positivo da resposta pró-inflamatória, o que indica seu papel nos estádios de promoção e progressão do câncer.[48] A ativação do NF-kB aumenta a expressão de genes antiapoptóticos, como *BCL2*, *BCL3*, *BCLXL*, *CIAP1*, *CIAP2*, *XIAP*, *TRAF1*, *TRAF2*, *SOD2* e *A20*. Além disso, regula a expressão de genes envolvidos com os processos de invasão celular e angiogênese, dentre os quais aqueles que codificam moléculas de adesão, como a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), a molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) e a E-selectina, além de enzimas e substâncias envolvidas no processo inflamatório, como ciclo-oxigenase 2 (COX-2), óxido nítrico sintase induzível (iNOS), quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias.[49]

Um dos genes regulados pelo NF-kB é o da COX-2, enzima limitante no metabolismo do ácido araquidônico. Geralmente, a expressão da COX-2 não é detectada em tecidos normais, porém, esta é induzida por inflamação e hipóxia, e a sua atividade forma preferencialmente a prostaglandina E2 (PGE2).[48] Muitos CBA inibem a ativação do NF-kB. O Quadro 18.1 apresenta diversos flavonoides e seus efeitos sobre os biomarcadores inflamatórios.[46]

Diversos extratos de frutos denominados *berries* (frutas vermelhas) apresentam atividade anti-inflamatória, efeito atribuído às antocianinas. Entre as antocianinas mais comuns encontradas em *berries* e na maioria dos frutos e verduras estão a cianidina-3-*O*-glucosídeo e a peonidina-3-*O*-glucosídeo em *cranberries*; a pelargonidina-3-*O*-glucosídeo no morango; e a cianidina-3-*O*-glucosídeo na amora-preta.[14] O extrato rico em antocianinas de amora silvestre (*Morus nigra*), em modelo

Quadro 18.1 Alvos moleculares de flavonoides na inibição do processo inflamatório.

Flavonoides	Marcadores inflamatórios (alvos)	Fonte alimentar
	Flavonóis	
Quercetina	↓ NF-kB, ↓ AP-1	Cebola, maçã, rúcula
Caempferol	↓ PGE2, ↓ COX-2, ↓ NF-kB	
Miricetina	↓ COX-2, ↓ NF-kB	
Isoramnetina	↓ NF-kB	
	Flavanonas	
Naringenina	↓ iNOS, ↓ NO, ↓ NF-kB	Cítricos
Hesperedina	↓ NF-kB, ↓ p38, ↓ JNK	
Taxifolina	↓ ICAM-1	
	Antocianinas	
Cianidina	↓ NF-kB, ↓ PGE2, ↓ COX-2	Amora-preta Berinjela Uva, vinho
Delfinidina	↓ NF-kB	
Malvidina	↓ IL-6	
	Isoflavonas	
Genisteína	↓ NF-kB, ↓ IL-8, ↓ ligação DNA-NF-kB	Soja
Daidzeína	↓ NF-kB, ↓ iNOS, ↓ NO	

AP-1: proteína ativadora 1; COX-2: ciclo-oxigenase 2; ICAM-1: molécula de adesão intercelular 1; IL-6: interleucina 6; IL-8: interleucina 8; iNOS: óxido nítrico sintase induzível; JNK: quinase c-jun amino-terminal; NF-kB: fator nuclear kappa B; NO: óxido nítrico; p38: proteína quinase ativada por mitógeno p38; PGE2: prostaglandina E2. **Fonte:** adaptado de Prasad et al.[46]

de peritonite induzido por LPS em camundongos, foi capaz de reduzir o influxo de leucócitos no local do estímulo, bem como a expressão da COX-2.[50] Outras *berries*, como morango, *cranberry* e mirtilo, em diferentes concentrações, tempo de administração, tipo de apresentação do alimento, quando administradas a indivíduos saudáveis ou com diferentes condições crônicas associadas à inflamação, também foram capazes de reduzir diversos biomarcadores inflamatórios. Dentre os biomarcadores modulados, destaca-se a expressão das enzimas iNOS, COX-2, IL-1b e IL-6, bem como das quimiocinas ICAM-1 e VCAM-1.[43] Os possíveis mecanismos que resultam na redução desses biomarcadores inflamatórios envolvem:

- Mecanismos antioxidantes diretos, os quais reduzem as ERO resultantes da resposta inflamatória.
- Modulação de vias de sinalização sensíveis ao estado redox da célula (via de sinalização MAPK).
- Modulação da via de sinalização do NF-kB e regulação negativa da expressão de genes pró-inflamatórios.[43, 51, 52]

Flavanonas, como a hesperidina e a naringenina, características em frutas cítricas, também apresentam a propriedade de modular a expressão de diversos genes que codificam enzimas e citocinas pró-inflamatórias, em modelos animais e humanos, por meio da regulação das vias de sinalização do NF-kB e da MAPK.[53, 54] Além disso, estudo clínico realizado com indivíduos saudáveis e dieta hiperlipídica revelou que a ingestão de suco de laranja como fonte de flavanonas, em dose única, reduziu a expressão de receptores de membrana do tipo *toll* 2 e 4 (TLR-2 e TLR-4),[55] importantes para a ativação da resposta inflamatória. Tais receptores são importantes, pois são ativados em resposta a componentes alimentares, assim como os LPS, capazes de induzir a cascata de sinalização do NF-kB.

Assim, alimentos de origem vegetal que apresentem compostos que possam inibir parcialmente a ativação do NF-kB podem ser potenciais candidatos à redução do risco de desenvolvimento de DCNT, possivelmente, por modular as respostas anti-inflamatória e antioxidante.

O Nfr2 tem sido relacionado à capacidade de antagonizar o fator de transcrição NF-kB de maneira indireta, uma vez que, ao atuar na diminuição do estresse oxidativo, reduz a ativação da via de sinalização do processo inflamatório.[29, 56] Neste contexto, flavonoides e/ou outros CBA que possam modular o fator de transcrição Nfr2 também podem ter importante papel na citoproteção contra o processo inflamatório crônico.[29, 56]

POLIFENÓIS E ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS

Ação de polifenóis na metilação do DNA e na modificação de histonas

A metilação do DNA é a modificação epigenética mais comum que envolve a ligação de grupos metil às citosinas nos nucleotídeos CpG. A abundância de grupos metil (hipermetilação) na região promotora de um gene promove o seu silenciamento ou inativação. Já a modificação de histonas, incluindo a metilação, a acetilação e, menos frequentemente, a fosforilação e a ubiquitinação de resíduos de aminoácidos, é outro mecanismo epigenético importante. Muitas modificações das histonas, assim como acontece com a metilação do DNA, são reversíveis e controladas por enzimas que adicionam ou removem radicais, alterando a conformação da cromatina, o acesso de fatores de transcrição às regiões promotoras de genes e, assim, a expressão destes.[57] Mais detalhes sobre mecanismos epigenéticos podem ser obtidos no Capítulo 5.

Existem muitas evidências de que a resposta do organismo à alimentação ocorre, em grande parte, por meio de mecanismos epigenéticos. Enquanto a metilação do DNA é geralmente associada à repressão da expressão gênica, as alterações em histonas podem promover tanto a ativação quanto a repressão, dependendo da modificação dos resíduos e dos aminoácidos envolvidos. Essas alterações envolvem a ação de histonas acetil transferases (HAT) e metil transferases (HMT), de histonas deacetilases (HDAC) e desmetilases (HDM). Normalmente, a acetilação do resíduo de lisina sete promove a abertura da cromatina, favorecendo a transcrição, enquanto a desacetilação desse resíduo tem o efeito contrário.

Alguns exemplos da ação de polifenóis, seus alvos moleculares e possíveis mecanismos epigenéticos estão descritos no Quadro 18.2.

Polifenóis e modulação da expressão de microRNA

Outro mecanismo que permite explicar como os nutrientes e CBA influenciam a manutenção da saúde envolve a modulação da expressão de microRNA (miR). Os miR são pequenas sequências de RNA, de 18 a 25 nucleotídeos, que não codificam proteínas. Participam do silenciamento pós-transcricional da expressão gênica, ligando-se por complementaridade à região 3'-UTR do RNAm, o que resulta na inibição da tradução ou na degradação do RNAm. Mais de 2 mil sequências de miR já foram descritas, e estima-se que esses pequenos RNA possam regular até dois terços de todos os transcritos.[57]

Quadro 18.2 Ação epigenética de polifenóis e possíveis mecanismos envolvidos (*)

Modificação	Composto	Alimento	Mecanismo epigenéticos
Metilação do DNA	Apigenina	Salsão	Inibição da metilação do DNA pela DNMT
	Antocianinas	Frutas vermelhas	
	Quercetina	Maçã	
	Ácido cafeico	Café	
	Resveratrol	Uva	
	Ácido elágico	Morango	
	Polifenóis do chá	Chá-verde	
	Genisteína	Soja	
Modificação de histonas	Genisteína	Soja	Ativa HAT. Inibe HDAC. Resulta na acetilação de várias histonas
	Quercetina	Frutas vermelhas	Inibe HAT. Ativa SIRT-1. Influencia a expressão de IP-10 e MIP-2
	Resveratrol	Uva	
	Polifenóis do chá	Chá	
	Resveratrol	Uva	Ativa SIRT-1. Influencia a expressão de TNF-alfa, IL-8, RBP
	Epigalocatequina 3-galato	Chá-verde	Inibe HAT. Reduz acetilação de histonas.
MicroRNA	Epigalocatequina 3-galato	Chá-verde	Aumenta miR-16 e modifica expressão de outros 60 miR
	Genisteína	Soja	Modula expressão de miR-27 e aumenta a de miR-146

DNMT: DNA metil transferase; HAT: histona acetil transferase; HDAC: histona desacetilase; IL-8: interleucina 8; IP-10: proteína 10 induzida por interferon gama; MIP-2: proteína inflamatória de macrófagos 2; RBP: proteína ligadora de RNA; SIRT-1: sirtuina-1; TNF-alfa: fator de necrose tumoral alfa. **Fonte:** adaptado de Barnett et al.[58]

Revisão abrangente sobre o possível papel dos miR circulantes como marcadores da dieta, do estado nutricional e de doenças foi realizada por Ross e Davis.[57] Essa revisão discute as pesquisas sobre dieta e miR e o papel destes no câncer, nas doenças cardiovasculares, no diabete e na adipogênese, bem como sugere direções para pesquisas. São destacados os efeitos de alimentos como chá, cacau, frutas e de CBA, como resveratrol, epigalocatequina, quercetina, curcumina e outros na modulação da expressão de diversos miR. Destaca-se que os miR participam do controle do desenvolvimento, da diferenciação e da proliferação celular, da inflamação e do metabolismo, em doenças como o câncer e no processo de senescência. Além disso, o padrão de expressão de miR circulantes (em fluidos corporais como sangue e saliva) emerge como biomarcador de doenças ou de suscetibilidade a doenças e de exposição à alimentação. A expressão de miR circulantes responde rapidamente a estímulos externos, modulando a expressão gênica, e talvez seja o mecanismo epigenético com maior potencial de ação na manutenção da saúde por meio da alimentação.[57]

Um exemplo diz respeito à modulação da inflamação pela alimentação envolvendo o miR-155. MiR-155, miR-21, miR-181b e miR-34a são os mais investigados em relação à inflamação e estão envolvidos na regulação dos TLR e da via de sinalização do NF-kB,[59] bem como na regulação da produção de citocinas pró-inflamatórias. Sua menor expressão foi associada à redução da inflamação crônica, da hipertensão e de DCV. O efeito foi obtido pela ação de polifenóis de romã, como resveratrol e quercetina. Esses compostos reduziram a ação do miR-155, o que promoveu aumento da síntese do NO e redução do NF-kB e do TNF-alfa.[57, 60] Ainda, a suplementação de pacientes hipertensos e com DM2 durante 12 meses com extrato de uva resultou em redução na expressão de citocinas pró-inflamatórias, entre elas a do TNF-alfa e da IL-1beta, além da redução na expressão do miR-155 e miR-34a, a qual foi associada à regulação do NF-kB e à sinalização de TLR.[61]

Outro polifenol, o resveratrol, presente em uvas e vinhos, atuou na redução da expressão de diversos miR característicos de células de câncer de cólon, como miR-21, miR-196a, miR-25, miR-17 e miR-92a-2.[62] Da mesma forma, o resveratrol também reduziu o aumento da expressão do miR-155 oncogênico de maneira depende ao miR-663, o qual também foi regulado pelo resveratrol.[63]

A ECGC, flavonoide encontrado no chá-verde, também modifica a expressão da família miR-let-7 , que tem

como alvo molecular a proteína RAS. O efeito biológico resultante se observa no metabolismo da glicose e na sensibilidade à insulina.[60] Também demonstrou-se que a EGCG, em cultura de carcinoma hepatocelular humano, atua aumentando a expressão do miR-16, que tem como alvos RNAm de proteínas que medeiam a apoptose via proteína Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*).[64]

Contudo, a ação dos compostos bioativos sobre o miR parece controversa. Observou-se que a quercitina aumenta a expressão de miR-122, com efeito benéfico no metabolismo do colesterol; por outro lado, as proantocianidinas da uva reduziram a expressão desse miR, com efeito sobre o metabolismo hepático e aumento da síntese do colesterol.[57,60]

Assim, apesar de os mecanismos de ação dos compostos bioativos na modulação do perfil de expressão de miR e seu significado biológico ainda não estarem completamente esclarecidos, essa pode ser uma possível abordagem no controle do início e progressão de diversas doenças.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O processo inflamatório e o estresse oxidativo são evidenciados e relacionados ao início e à progressão de uma série de doenças de desenvolvimento crônico. Diversos CBA, principalmente os polifenóis, parecem modular de maneira positiva a via de sinalização do Nrf2, atenuando o estresse oxidativo e, de maneira negativa, a via de sinalização do NF-kB, reduzindo o processo inflamatório. Os mecanismos pelos quais os polifenóis atuam sobre esses dois processos não são completamente esclarecidos; contudo, sabe-se que os efeitos benéficos provenientes da ingestão contínua desses compostos, por meio da alimentação, advêm de um conjunto de ações relacionadas às diversas vias de sinalização e metabolismo, e não de um único mecanismo. Ainda, diferentes CBA podem atuar sobre um mesmo mecanismo e/ou em diferentes níveis.

Ademais, os estudos sobre a relação entre a ação de miR e alimentação/saúde/doença estão no início, sendo necessários mais ensaios controlados sobre as ações de miR circulantes e de outros marcadores. É preciso também considerar as interações entre os diversos compostos da alimentação e a sua transformação pela microbiota intestinal, o que pode resultar na produção e absorção de novas moléculas bioativas diferentes daquelas que existem nos alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas MI, Corella D, Arós F et al. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean Diet. N Engl J Med. 2013;368:1279-90.
2. World Health Organization Global status report on communicable diseases (WHqlibdoc.who.int/publication/2011).
3. Del Rio D, Roriguez-Mateos A, Spencer JPE, Tognolini M, Borges G, Crozier A. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. Antioxidants & Redox Signaling. 2013;18:1818-92.
4. Ellan S, Williamson G. Cocoa and human health. Annu. Ver. Nutr. 2013;33:105-28.
5. Alissa E, Ferns GA. Functional foods and nutraceuticals in the primary prevention of cardiovascular diseases. J Nutr Metabol. 2012;1-16.
6. Williamson G, Manach C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. Am J Clin Nutr. 2005;81:243S-255S.
7. Pan MH, Lai CS, Ho CT. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. Food Funct. 2010;1:15-31.
8. Chuang CC, McIntosh MK. Potential mechanisms by which polyphenol-rich grapes prevent obesity – mediated inflammation and metabolic diseases. Annu Ver Nutr. 2011;31:155-76.
9. Varamini B, Baur JA. Polyphenol resveratrol alters global patterns of gene regulation and improves physiology through multiple potential pathways. In: Bydlack WR, Rodriguez RL. Nutritional genomics: the impact of dietary regulation of gene function on human disease. Boca Raton: CRC Press; 2011.
10. Jones DP, Park Y, Ziegler TR. Nutritional metabolomics: progress in adressing complexity in diet and health. Ann Rev Nutr. 2012;32:182-202.
11. Manach C, Hubert J, Llorach R, Scalbert A. The complex links between dietary phytochemicals and human health deciphered by metabolomics. Mol Nutr Food Res. 2009;53:1303-15.
12. Ommen BV, Keijer J, Heil SG, Kaput J. Challenging homeostasis to define biomarkers for nutritio related health. Mol Nutr Food Res. 2009;53:795-804.
13. Laparra HM, Sanz Y. Interaction of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. Pharmacological Research. 2010;61;219-25.
14. Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. Nat Prod Rep. 2009;26:1001-43.
15. Ramiro-Puig E, Castell M. Cocoa: antioxidant and immunomodulator. British Journal of Nutrition. 2009;101:931-40.
16. Wang Y, Ho CT. Polyphenolic chemistry of tea and coffee: a century of progress. J Agric Food Chem. 2009;57:8109-14.
17. Lamuela-Raventós M, Romero-Peréz AI, Andrés-Lacueva C, Tornero A. Review: health effects of cocoa flavonoids. Food Science and Technology International. 2005;11:159-76.
18. Andersen OM, Markham KR. Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications. New York: Taylor & Francis Group; 2006.
19. Arabbi PR, Genovese MI, Lajolo FM. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. J Agric Food Chem. 2004;52:1124-31.
20. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. Biochem Soc Trans. 2007;35:1147-50.
21. Magesh S, Chen Y, Hu L. Small molecule modulators of Keap1-Nrf2-ARE pathway as potential preventive and therapeutic agents. Med Res Rev. 2012;32:687-726.
22. Soobrattee MA, Bahorun T, Aruoma OI. Chemopreventive actions of polyphenolic compounds in cancer. Biofactors. 2006;27:19-35.
23. Zhang M, An C, Gao Y, Leak RK, Chen J, Zhang F. Emerging roles of Nrf2 and phase II antioxidant enzymes in neuroprotection. Progress in Neurobiology. 2013;100:30-47.

24. Hollman PC, Cassidy A, Comte B, Heinonen M, Richelle M, Richling E et al. The biological relevance of direct antioxidant effects of polyphenols for cardiovascular health in humans is not established. J Nutr. 2011;141:989S-1009S.
25. Fernandez-Panchon MS, Villano D, Troncoso AM, Garcia-Parrilla MC. Antioxidant activity of phenolic compounds: from in vitro results to in vivo evidence. Crit Rev Food Sci Nutr. 2008;48:649-71.
26. Tan AC, Konczak I, Sze DM, Ramzan I. Molecular pathways for cancer chemoprevention by dietary phytochemicals. Nutr Cancer. 2011;63:495-505.
27. Tkachev VO, Menshchikova EB, Zenkov NK. Mechanism of the Nrf2/Keap1/ARE signaling system. Biochemistry (Mosc). 2011;76:407-22.
28. Bryan HK, Olayanju A, Goldring CE, Park BK. The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and independent mechanisms of regulation. Biochemical Pharmacology. 2013;85:705-17.
29. Kim J, Cha YN, Surh YJ. A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. Mutat Res. 2010;690:12-23.
30. Kwon KH, Barve A, Yu S, Huang MT, Kong, AN. Cancer chemoprevention by phytochemicals: potential molecular targets, biomarkers and animal models. Acta Pharmacol Sin. 2007;28:1409-21.
31. Cardozo LFMF, Pedruzzi LM, Stenvinkel P, Stockler-Pinto MB, Daleprane JB, Leite M Jr et al. Nutritional strategies to modulate inflammation and oxidative stress pathways via activation of the master antioxidant switch Nrf2. Biochimie. 2013;95:1525-33.
32. Na HK, Surh YJ. Modulation of Nrf2-mediated antioxidant and detoxifying enzyme induction by the green tea polyphenol EGCG. Food Chem Toxicol. 2008;46,1271-78.
33. Wang D, Wang Y, Wan X, Yang CS, Zhang J. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate triggered hepatotoxicity in mice: responses of major antioxidant enzymes and the Nrf2 rescue pathway. Toxicol Appl Pharmacol. 2015;283:65-74.
34. Wu CC, Hsu MC, Hsieh CW, Lin JB, Lai PH, Wung BS. Upregulation of hemeoxygenase-1 by epigallocatechin-3-gallate via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and ERK pathways. Life Sciences. 2006;78:2889-97.
35. Kweon MH, Adhami VM, Lee JS, Mukhtar H. Constitutive overexpression of Nrf2-dependent hemeoxygenase-1 in A549 cells con-tributes to resistance to apoptosis induced by epigallocatechin 3-gallate. J Biol Chem. 2006;281:33761-772.
36. Wiegand H, Wagner AE, Boesch-Saadatmandi C, Kruse HP, Kulling S, Rimbach G. Effect of dietary genistein on phase II and antoxidant enzyme in rat liver. Cancer Genomics Proteomics. 2009;6:85.
37. Tan XL, Shi M, Tang H, Han W, Spivack SD. Candidate dietary phytochemicals modulate expression of phase II enzymes GSTP1 and NQO1 in human lung cells. J Nutr. 2010;140(8):1404-10.
38. Tanigawa S, Fujii M, Hou DX. Action of Nrf2 and Keap1 in ARE-mediated NQO1 expression by quercetin. Free Radic Biol Med. 2007;42:1690-703.
39. Hwang YP, Choi JH, Yun HJ, Han EH, Kim HG, Kim JY et al. Anthocyanins from purple sweet potato attenuate dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats by inducing Nrf2-mediated antioxidant enzymes and reducing COX-2 and iNOS expression. Food Chem Toxicol. 2011;49:93-99.
40. Palsamy P, Subramanian S. Resveratrol protects diabetic kidney by attenuating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammatory cytokines via Nrf2-Keap1 signaling. Biochim Biophys Acta. 2011;1812:719-31.
41. Eggler AL, Gay KA, Mesecar AD. Molecular mechanisms of natural products in chemoprevention: induction of cytoprotective enzymes by Nrf2. Mol Nutr Food Res. 2008;52:S84-94.
42. Wu X, Schauss AG. Mitigation of inflammation with foods. J Agric Food Chem. 2012;60:6703-17.
43. Joseph SV, Edirisinghe I, Burton-Freeman BM. Berries: anti-inflammatory effects in humans. J Agric Food Chem. 2014;62:3886-903.
44. Tangney CC, Rasmussen HE. Polypenols, inflammation, and cardiovascular disease. Curr Artheroscler Rep. 2013;15:324.
45. González-Gallego J, García-Mediavilla MV, Sánchez-Campos S, Tuñón MJ. Fruit polyphenols, immunity and inflammation. Br J Nutr. 2010;104(Suppl 3):S15.
46. Prasad S, Phromnoi K, Yadav VR, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Targeting inflammatory pathways by flavonoids for prevention and treatment of cancer. Planta Med. 2010;76:1044-63.
47. Rahman I, Biswas SK, Kirkham PA. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. Biochem Pharmacol. 2006;72:1439-52.
48. Karin M. Nuclear factor-kB in cancer development and progression. Nature. 2006;441:431-436.
49. Bharti AC, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy. Biochem Pharmacol. 2002;64:883-88.
50. Hassimotto NMA, Moreira V, Nascimento NG, Souto PC, Teixeira C, Lajolo FM. Inhibition of carrageenan-induced acute inflammation in mice by oral administration of anthocyanin mixture from wild mulberry and cyanidin-3-glucoside. Biomed Res Int. 2013;146716.
51. Nile SH, Park SW. Edible berries: bioactive components and their effect on human health. Nutrition. 2014;30:134-44.
52. Rodriguez-Mateos A, Heiss C, Borges G, Crozier A. Berry (poly)phenols and cardiovascular health. J Agric Food Chem. 2014;62:3842-51.
53. Coelho RC, Hermsdorff HH, Bressan J. Anti-inflammatory properties of orange juice: possible favorable molecular and metabolic effects. Plant Foods Hum Nutr. 2013;68:1-10.
54. Parhiz H, Roohbakhsh A, Soltani F, Rezaee R, Iranshahi M. Antioxidant and anti-inflammatory properties of the Citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: An updated review of their molecular mechanisms and experimental models. Phytother Res. 2015;29:323-31.
55. Ghanim H, Sia CL, Upadhyay M, Korzeniewski K, Viswanathan P, Abuaysheh S. Orange juice neutralizes the proinflammatory effect of a high-fat, high-carbohydrate meal and prevents endotoxin increase and Toll-like receptor expression. Am J Clin Nutr. 2010;91:940-49.
56. Jin W, Wang H, Yan W, Xu L, Wang X, Zhao X et al. Disruption of Nrf2 enhances upregulation of nuclear factor-kappa B activity, proinflammatory cytokines, and intercellular adhesion molecule-1 in the brain after traumatic brain injury. Mediators Inflamm. 2008;1-7.
57. Ross SA, Davis CD. The emerging role of microRNAs and nutrition in modulating health and disease. Annu Rev Nutr. 2014;34:305-36.
58. Barnett MPG, Basset SA, Bermingham EN. Epigenetics – What role could this play in functional foods and personalized nutrition? In: Ferguson LR. Nutrigenomics and nutrigenetics in functional foods and personalized nutrition. Boca Raton: CRC Press; 2014
59. Ma X, Becker Buscaglia LE, Barker JR, Li Y. MicroRNAs in NF-kappaB signaling. J Molecular Cell Biology. 2011;3:159-66.

60. Moore KJ, Rayner KJ, Suárez Y, Fernández-Hernando C. The role of MicroRNAs in cholesterol efflux and hepatic lipid metabolism. Annu. Rev. Nutr. 2011;31:49-63.
61. Tomé-Carneiro J, Larrosa M, Yáñez-Gascón MJ, Dávalos A, Gil-Zamorano J, Gonzálvez M et al. One-year supplementation with a grape extract containing resveratrol modulates inflammatory-related microRNAs and cytokines expression in peripheral blood mono-nuclear cells of type 2 diabetes and hypertensive patients with coronary artery disease. Pharmacol Res. 2013;72:69-82.
62. Tili E, Michaille JJ, Alder H, Volinia S, Delmas D, Latruffe N et al. Resveratrol modulates the levels of microRNAs targeting genes encoding tumor-suppressors and effectors of TGF-beta signaling pathway in SW480 cells. Biochem Pharmacol. 2010a;80:2057-65.
63. Tili E, Michaille JJ, Adair B, Alder H, Limagne E, Taccioli C et al. Resveratrol decreases the levels of miR-155 by upregulating miR-663, a microRNA targeting JunB and JunD. Carcinogenesis. 2010b;31:1561-66.
64. Parasramka MS, Ho E, Williams DE, Dashwood RH. MicroRNAs, diet, and cancer: new mechanistic insights on the epigenetics ac-tions of phytochemicals. Mol Carcinog. 2012;213-230.

Parte 4

Nutrientes, genômica nutricional e relação saúde-doença

Inflamação | 19

Marcelo Macedo Rogero
Maria Carolina Borges
William Festuccia

INTRODUÇÃO

Nutrientes são substâncias fundamentais para a sobrevivência e o crescimento celular. Atuam tanto como substratos para a produção de energia quanto como componentes de diversas estruturas celulares. Podem ser separados em duas grandes classes: macro (carboidratos, lipídios e proteínas) e micronutrientes (vitaminas e minerais). Além de suas funções energéticas e estruturais, eles são importantes reguladores de processos biológicos em seres humanos, por meio do controle de significativas vias de sinalização intracelular. Praticamente todas as células do organismo humano possuem proteínas ou complexos proteicos que apresentam a capacidade de detectar variações na concentração de nutrientes específicos nos meios intra e extracelular e, desse modo, promover alterações morfológicas e funcionais que garantam a adaptação e a sobrevivência celular nas condições nutricionais prevalentes.[1]

Proteínas conhecidas como sensores de nutrientes podem estar localizadas em diversos compartimentos celulares, os quais incluem membrana plasmática, citosol, organelas ou núcleo, onde desencadeiam, após ativação direta ou indireta por determinado nutriente, cascatas de sinalização intracelular que modulam processos biológicos importantes, como a proliferação, o crescimento e a diferenciação celular, a secreção hormonal, a função imune e o metabolismo celular, entre outros. Evolutivamente, o surgimento dos sensores de nutrientes permitiu o ajuste fino da atividade metabólica e funcional celular de acordo com a disponibilidade de nutrientes, garantindo assim condições adequadas não só de energia, mas também de esqueletos de carbono para o correto funcionamento celular. É importante ressaltar que o desequilíbrio na atividade dos sensores de nutrientes, causado por deficiência ou excesso crônico de ingestão de nutrientes, pode estar associado com o desenvolvimento de doenças metabólicas e inflamatórias crônicas. Evidências recentes, por exemplo, sugerem que a exposição de tecidos metabólicos, como o fígado, o músculo esquelético e o tecido adiposo, ao excesso de nutrientes é um evento importante no desenvolvimento de processo inflamatório crônico e de baixa intensidade, bem como de resistência à ação da insulina em pacientes que apresentam obesidade visceral e síndrome metabólica.[2]

Assim, este capítulo abordará os mecanismos pelos quais as células detectam e respondem às alterações na concentração de alguns tipos específicos de nutrientes. Ênfase especial será dada à discussão das alterações da expressão gênica induzidas pela ativação de sensores de nutrientes, bem como o possível envolvimento dessas moléculas no início, na manutenção e na resolução de processos inflamatórios.

INFLAMAÇÃO

A função primordial da resposta inflamatória é a destruição de microrganismos, o que envolve a participação de células efetoras, as quais entram em contato com agentes estranhos no tecido infectado. Nesse contexto, verifica-se que componentes presentes em bactérias Gram-negativas, como lipopolissacarídeos (LPS), podem desencadear a resposta inflamatória por meio da sua interação com receptores de superfície celular presentes, por exemplo, em células do sistema imune, como macrófagos e neutrófilos. A inflamação em resposta a microrganismos é iniciada pelo aumento da síntese de citocinas – especialmente o fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) e a interleucina 1 (IL-1) – e de quimiocinas, que atuam em células endoteliais e leucócitos, com o intuito de pro-

mover o recrutamento e a ativação de leucócitos no foco inflamatório.[3, 4]

A inflamação aguda apresenta três principais componentes:

- Alterações no calibre vascular, que resultam no aumento do fluxo sanguíneo no foco inflamatório.
- Alterações estruturais na microcirculação, que favorecem a saída de proteínas plasmáticas e de leucócitos do sangue para o tecido.
- Adesão e transmigração de leucócitos da microcirculação para o tecido e sua posterior ativação, o que promove a eliminação do agente nocivo.

À medida que há redução da presença do agente agressor, verifica-se diminuição da resposta inflamatória por meio da ativação de mecanismos anti-inflamatórios.[3,4]

Entre os mediadores envolvidos na resposta inflamatória, destacam-se a histamina, a bradicinina, os neuropeptídeos, as prostaglandinas, os tromboxanos, os leucotrienos e o fator ativador de plaquetas (PAF). A geração de eicosanoides – mediadores de origem lipídica – ocorre, inicialmente, pela ativação da enzima fosfolipase A_2, que hidrolisa fosfolipídios de membrana em ácidos graxos livres e lisofosfolipídios. Entre os ácidos graxos liberados pela fosfolipase A_2, predomina o ácido graxo araquidônico. Posteriormente, esses ácidos graxos são utilizados como substratos pelas enzimas ciclo-oxigenase (COX) – as quais dão origem a prostaglandinas e a tromboxanos – e lipoxigenase, que forma leucotrienos. Tais mediadores inflamatórios apresentam diversas funções na resposta inflamatória, como vasodilatação (prostaglandinas) e migração e ativação de neutrófilos (leucotrieno B4).[5, 6]

Não obstante, cabe destacar que a resposta inflamatória não é apenas induzida por microrganismos, uma vez que ela pode ser desencadeada por obesidade ou diabete, entre outras condições clínicas, que promovem aumento da concentração plasmática de biomarcadores inflamatórios, como citocinas pró-inflamatórias (incluindo TNF-alfa e IL-6) e proteínas de fase aguda (proteína C reativa – PCR – e proteína sérica amiloide A, entre outras).[7, 8] No tocante à obesidade, destaca-se a existência de correlação positiva entre a massa de tecido adiposo e a expressão do gene que codifica o TNF-alfa em adipócitos.[4]

Diante dessas informações, pode-se questionar a participação da resposta inflamatória induzida pela obesidade na gênese da resistência periférica à ação da insulina. Nesse contexto, constata-se que o TNF-alfa causa resistência à insulina por inibir a fosforilação do resíduo de tirosina presente na proteína denominada substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1). Outros mecanismos de inibição da fosforilação do IRS-1 por mediadores inflamatórios incluem a ativação crônica das proteínas denominadas Jun N-terminal quinase (JNK), proteína quinase C (PKC) e quinase do inibidor do kappa B (IKK).[2] Além da síntese do TNF-alfa, o tecido adiposo produz outras adipocinas, como a resistina, a adiponectina, a leptina e a proteína quimiotática para monócitos 1 (MCP-1), as quais exercem efeitos em diversas vias metabólicas, bem como na resposta inflamatória. Concomitantemente ao aumento de adipocinas pró-inflamatórias, como resistina e MCP-1, verifica-se que em indivíduos obesos há redução da síntese de adipocinas anti-inflamatórias, como a adiponectina.[8]

Inflamação e receptores do tipo *Toll*

O sistema imune inespecífico de mamíferos utiliza estratégias distintas para o reconhecimento de microrganismos, uma das quais se baseia no reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP, *pathogen-associated molecular patterns*), os quais são produtos do metabolismo microbiano conservados ao longo da evolução das espécies. Por exemplo, o padrão molecular do LPS é comum para todas as bactérias Gram-negativas, porém não é sintetizado pelo hospedeiro.[9, 10] Receptores do sistema imune inato que reconhecem Pamp são denominados receptores de reconhecimento de padrões, os quais induzem a expressão de citocinas pró-inflamatórias, ao mesmo tempo em que ativam mecanismos de defesa antimicrobianos do hospedeiro, como a síntese de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN). O reconhecimento dos PAMP também pode acarretar a indução das moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 na superfície de células apresentadoras de antígenos, como macrófagos e células dendríticas.[11, 12] A indução das moléculas coestimulatórias, juntamente com a apresentação de pequenos peptídeos antigênicos ligados às moléculas de classe II do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) na membrana das células apresentadoras de antígeno para linfócitos T $CD4^+$, acopla o reconhecimento de patógenos pelo sistema imune inato com a ativação das respostas imunes adaptativas.[10]

O sistema imune inato reconhece PAMP por meio de receptores do tipo *Toll* (TLR), os quais compreendem uma família de proteínas transmembrana que desempenham papel fundamental na defesa do hospedeiro.[13] Os TLR são membros da superfamília do receptor de IL-1 (IL-1R) e apresentam homologia significante em suas regiões citoplasmáticas, como o domínio do receptor *Toll*/IL-1 (TIR). Baseando-se na sequência de aminoácidos e na estrutura genômica, os TLR podem ser divididos em cinco subfamílias: TLR2, TLR3, TLR4,

TLR5 e TLR9. A subfamília TLR2 é composta de TLR1, TLR2, TLR6 e TLR10, enquanto a subfamília TLR9 é composta de TLR7, TLR8 e TLR9.[9, 14] A principal função das proteínas TLR está relacionada ao controle das respostas inflamatória e imunológica. Como outros receptores de reconhecimento de antígenos, o TLR medeia o reconhecimento de uma variedade de PAMP microbianos. O primeiro TLR caracterizado em humanos foi o TLR4, o qual é expresso predominantemente em células do sistema imune, incluindo macrófagos e células dendríticas.[11, 12, 15, 16]

O LPS é um componente estrutural integral e predominante da membrana externa de bactérias Gram negativas, além de representar um dos mais potentes iniciadores microbianos da inflamação.[17] O LPS é um complexo glicolipídico composto de um polissacarídeo hidrofílico e um domínio hidrofóbico denominado lipídio A (Figura 19.1). O LPS ativa monócitos e macrófagos para produzirem citocinas pró-inflamatórias como TNF-alfa, IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12, as quais, por sua vez, atuam como mediadoras endógenas da inflamação por meio de interações mediadas por receptores com diversas células alvo.[18, 19] Macrófagos também secretam, em resposta ao LPS, vasta gama de outros mediadores biológicos, incluindo PAF, prostaglandinas, enzimas e ERO e ERN, como ânion superóxido e óxido nítrico (NO), respectivamente. A síntese de citocinas pró-inflamatórias e de mediadores biológicos por monócitos e macrófagos inibe o crescimento e impede a disseminação de patógenos que eventualmente tenham invadido o organismo.[12]

O LPS inicialmente liga-se a uma proteína presente no sangue ou no espaço extracelular denominada proteína ligadora de LPS (LBP, *LPS-binding protein*). A LBP facilita a ligação do LPS na superfície da célula à molécula CD14, uma proteína que está ancorada à bicamada lipídica por meio de um grupo glicofosfatidil inositol e que está presente na maioria das células, com exceção daquelas do endotélio. O CD14 também pode existir como uma proteína solúvel e, nesse caso, pode carrear o LPS para a superfície celular.[20, 21] A molécula de CD14 não apresenta domínios transmembrânicos e intracelulares e, desse modo, não pode isoladamente iniciar o processo de transdução de sinal. Uma vez que o LPS se liga ao CD14, a LBP dissocia-se e o complexo LPS-CD14 fisicamente associa-se com o receptor do tipo TLR4.[12, 19] O TLR4 necessita de uma molécula adicional, a proteína acessória extracelular (MD-2), que forma um complexo com o domínio extracelular do TLR4 para o efetivo reconhecimento do LPS (Figura 19.2).[22]

O reconhecimento de PAMP pelo TLR desencadeia a associação dependente do domínio TIR com adaptadores contendo o domínio TIR, incluindo a proteína adaptadora citoplasmática (MyD88), a proteína adaptadora contendo o domínio TIR associada ao adaptador seme-

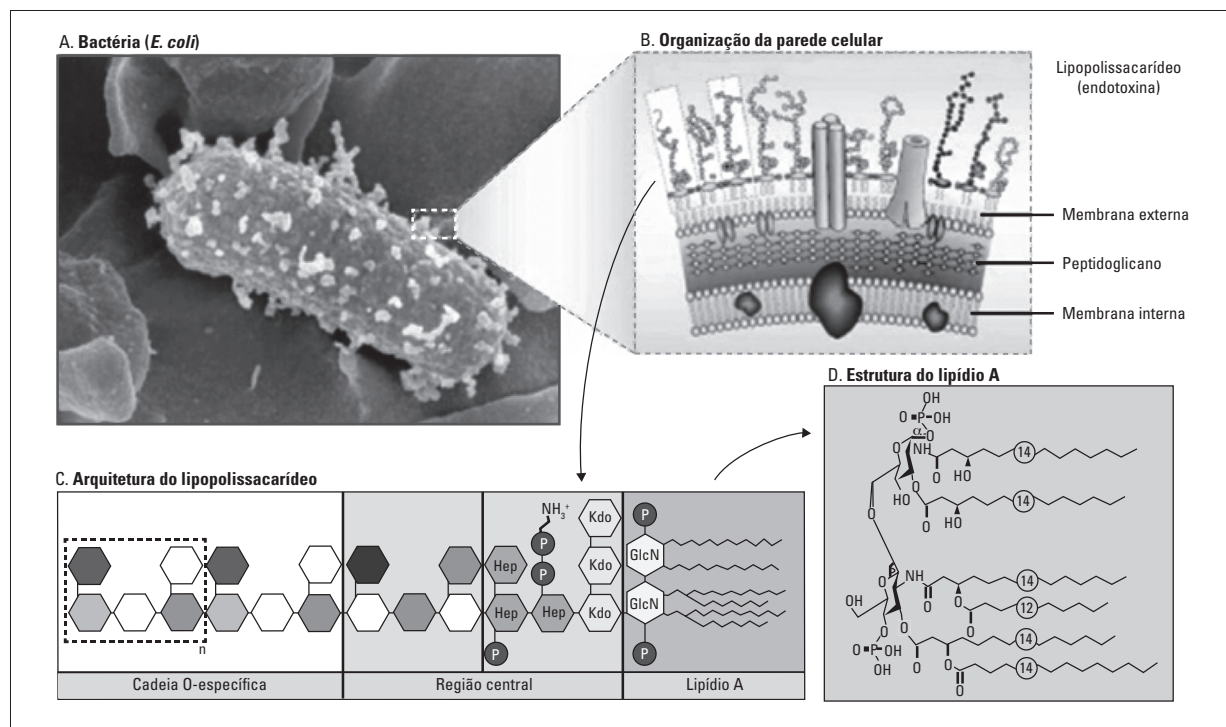



Figura 19.1 Bactéria Gram-negativa. (A) Eletromicrografia de *Escherichia coli*, juntamente com representação esquemática da localização do lipopolissacarídeo na parede celular bacteriana (B) e arquitetura do LPS (C). (D) Estrutura tóxica do LPS, o componente lipídio A. GlcN: D-glicosamina; Hep: L-glicero-D-mano-heptose; Kdo: 2-ceto-3-deoxi-ácido octulosônico; P: fosfato. **Fonte:** adaptada de Beutler e Rietschel.[19]

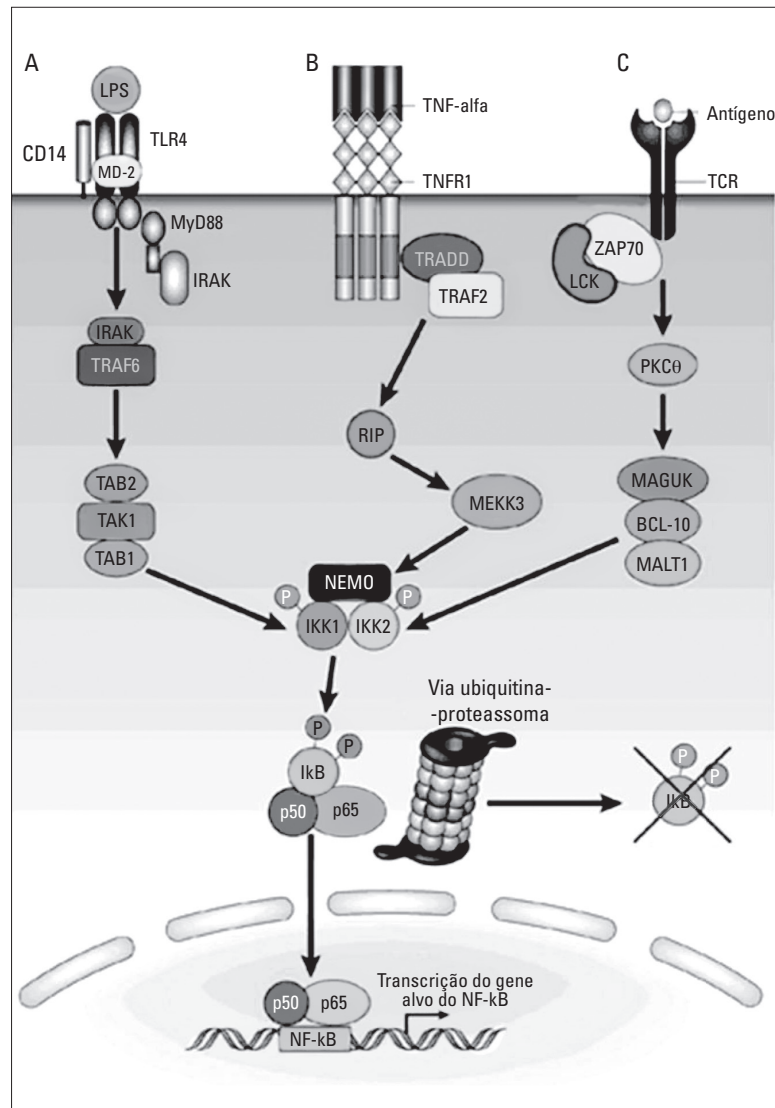



Figura 19.2 Vias de ativação do fator nuclear kappa B (NF-kB). A atividade do NF-kB é estimulada por diversas vias, incluindo lipopolissacarídeos (LPS), fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) e sinalização mediada por receptores presentes em linfócitos T (TCR). As quinases IKK1 e IKK2 (também denominadas IKK alfa e IKK beta, respectivamente) e o modulador essencial da subunidade regulatória do NF-kB (NEMO) (também denominado IKK gama) são o ponto de convergência para todas as três vias. ERK: quinase regulada por sinal extracelular; IkB: inibidor do NF-kB; IKK: quinase do inibidor de IkB; IRAK: quinase associada ao receptor de interleucina 1; LCK: proteína com atividade tirosina quinase; MD-2: proteína acessória extracelular; MALT-1 e BCL-10: proteínas associadas ao linfoma do tecido linfoide associado à mucosa; MAP: proteína ativada por mitógenos; MEKK3: MAP/ERK quinase quinase 3; MAGUK: quinase guanilato associada à membrana; MyD88: proteína adaptadora citoplasmática; PKCθ: proteína quinase C θ; RIP: quinase serina/treonina de interação com receptor; TLR4: receptor do tipo *Toll* 4; TNFR1: receptor 1 do TNF; TRAF2: fator 2 associado ao receptor de TNF; TRAF6: fator 6 associado ao receptor de TNF; TAB1: proteína ligadora de TAK1; TAB2: proteína ligadora de TRAF6 à TAK1; TAK1: quinase ativada pelo fator de transformação do crescimento beta; TRADD: receptor de TNF associado via domínio da morte; ZAP70: proteína quinase associada à cadeia zeta.
Fonte: adaptada de Li e Verma.[23]

lhante ao MyD88 (TIRAP-MAL), a TRIF-TICAM1 e a TRAM-TICAM2. A associação do TLR4 e da MyD88 recruta membros da família quinase associada ao receptor de IL-1 (IRAK); dois membros, IRAK4 e IRAK1, são sequencialmente fosforilados, o que promove a sua dissociação a partir do complexo receptor e sua posterior associação com a proteína denominada fator 6 associado ao receptor de TNF (TRAF6). A TRAF6 ativa quinases da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), as quais podem promover a ativação da proteína ativadora-1 (AP-1) por meio da MAPK (ver Figura 19.2).[11, 19, 24]

No citoplasma de células não estimuladas, o fator de transcrição nuclear kappa B (NF-kB) – que se apresenta na forma de dímero – encontra-se na forma inativa em razão de sua associação com proteínas denominadas inibidores do kB (IkB). A família de proteínas IkB inclui

IkB-alfa, IkB-beta, IkB-épsilon, Bcl-3 e as regiões carboxi-terminal do NF-kB$_1$ (p105), NF-kB$_2$ (p100). As proteínas IkB ligam-se, com diferentes afinidades e especificidades, a dímeros do NF-kB. Portanto, além da existência de diferentes dímeros de NF-kB em um tipo celular específico, há também grande número de combinações entre o IkB e os dímeros do NF-kB.[23, 25]

O TRAF6 promove a ativação do complexo de quinases do IkB (IKK).[11, 24] Esse complexo é composto de duas subunidades catalíticas, IKK-alfa e IKK-beta, e uma subunidade regulatória IKK-gama, e induz a fosforilação do IkB. A fosforilação do IkB resulta na sua poliubiquitinação, a qual, por sua vez, acarreta a sua degradação mediada pelo proteassoma 26S, o que permite, desse modo, que o NF-kB transloque para o interior do núcleo celular e ative a transcrição de diversos genes dependentes do kB, como aqueles de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF-alfa, IL-1beta e IL-6 (ver Figura 19.2). O NF-kB também promove a estimulação da síntese do IkB, uma vez que a região promotora do gene que codifica o IkB contém sítios funcionais para o NF-kB. Desse modo, o IkB recém-sintetizado liga-se ao NF-kB e suprime a sua atividade.[11, 12, 17, 26, 27]

Em mamíferos, a família de fatores de transcrição NF-kB apresenta cinco membros: NF-kB$_1$ (p105/p50), NF-kB$_2$ (p100/p52), RelA (p65), RelB e c-Rel, os quais podem dimerizar-se para formar homo e heterodímeros, que estão associados a respostas específicas para diferentes estímulos e efeitos diferenciais sobre a transcrição. NF-kB$_1$ (p50) e NF-kB$_2$ (p52) não apresentam domínios de ativação transcricional e seus homodímeros atuam como repressores.[23, 25] Por outro lado, Rel-A, Rel-B e c-Rel carreiam domínios de ativação transcricional e, com exceção do Rel-B, são capazes de formar homo e heterodímeros com os outros membros dessa família de proteínas. Consequentemente, o equilíbrio entre os diferentes homo e heterodímeros do NF-kB regula o nível de atividade transcricional. Cabe ressaltar que essas proteínas são expressas em um modelo específico celular e tecidual, que acarreta um nível adicional de regulação. Por exemplo, NF-kB$_1$ (p50) e RelA são amplamente expressos e, desse modo, o heterodímero p50/RelA constitui o mais comum indutor da atividade transcricional do NF-kB.[23, 25]

Inflamação e o receptor do TNF-alfa

A família de proteínas do TNF compreende proteínas de membrana e citocinas. Membros dessa família incluem o TNF, a linfotoxina (TNF-beta), os ligantes do Fas e do CD40, o OX-40, o receptor ativador do ligante do NF-kB (RANK-L) e o ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL), entre outras proteínas. No tocante aos receptores de membrana da família do TNF, destacam-se o receptor I do TNF (TNF-RI), o TNF-RII, o receptor de linfotoxina-beta (LT-betaR), o Fas, o CD40, o ligante do OX-40, RANK, entre outros.[28-30]

A ligação de membros da família do TNF aos seus respectivos receptores desencadeia uma série de efeitos biológicos intracelulares, grande parte dos quais é relacionada à ativação dos fatores de transcrição NF-kB e AP-1, o que resulta no aumento da transcrição de genes que codificam proteínas com ação pró-inflamatória.

As etapas envolvidas na ativação da via de sinalização do NF-kB e do AP-1, por meio da ligação do TNF-alfa ao seu receptor na membrana plasmática, são:[19, 31]

1. O TNF-alfa liga-se ao seu receptor (TNF-RI).
2. A proteína do domínio da morte (TRADD) liga-se ao TNF-RI e atua como molécula adaptadora.
3. As proteínas TRAF-2 e RIP-1 ligam-se ao TRADD. A proteína TRAF-2 ativa a cascata de proteínas MAPK, o que resulta na ativação da proteína JNK, na fosforilação da c-Jun e na formação do fator de transcrição AP-1, o qual é composto de c-Jun e Fos. A proteína RIP também promove a ativação de MAPK, que induz a fosforilação do complexo IKK, resultando na ativação da via de sinalização do NF-kB.
4. A ativação dos fatores de transcrição AP-1 e NF-kB resulta na ativação da transcrição de genes envolvidos na resposta inflamatória.

Inflamação e o receptor da IL-1

Apesar do receptor da IL-1 não ser um membro da família do TNF-R, muitos dos efeitos biológicos da IL-1 são similares àqueles observados pela ligação do TNF-alfa ao seu receptor, uma vez que a via de sinalização da IL-1 compartilha intermediários bioquímicos com a via do TNF. A ligação da IL-1 ao seu receptor (IL-1R) promove o recrutamento de uma proteína adaptadora denominada MyD88 e da quinase serina/treonina IRAK. A IRAK se autofosforila, se dissocia do complexo e, posteriormente, liga-se ao TRAF-6. O TRAF-6 ativa a quinase TAK-1, a qual, por sua vez, ativa tanto o NF-kB quanto o AP-1. Cabe ressaltar que essa via de sinalização da IL-1 compartilha das mesmas proteínas intracelulares estudadas na sinalização induzida pelo TLR4.[31]

Estresse oxidativo e inflamação

As ERO e as ERN apresentam papel relevante na indução da resposta inflamatória, uma vez que estão envol-

vidas na ativação de vias de sinalização intracelular. Em relação às ERN, destaca-se o papel importante do óxido nítrico (NO), que pode ser sintetizado em diferentes tipos celulares, incluindo células do endotélio vascular, macrófagos, neutrófilos e hepatócitos.[12]

De modo geral, o NO causa vasodilatação local e aumento da oferta de oxigênio. O NO é sintetizado a partir do aminoácido arginina por meio da reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), a qual apresenta três isoformas distintas: NOS neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS) e NOS induzível (iNOS). Cabe destacar que a nNOS e a eNOS são constitutivamente expressas nas células, enquanto a expressão gênica da iNOS é dependente de estímulos, como LPS e TNF, entre outros. Além disso, a via da iNOS é capaz de gerar quantidades significativamente maiores de NO quando comparada com a capacidade de síntese da eNOS e da nNOS.[32, 33]

O NO regula o balanço redox citoplasmático, além de reagir com o ânion superóxido (O_2^-), o que resulta na produção do peroxinitrito ($ONOO^-$), o qual atua como importante oxidante celular. O NO também regula eventos relacionados à transdução de sinais por meio da sinalização mediada pelo cálcio citoplasmático ou mitocondrial e da modificação pós-tradução de proteínas intracelulares.[33]

As ERO, como o peróxido de hidrogênio, apresentam capacidade elevada de ativar a via de sinalização do NF-kB, o que resulta em aumento da resposta inflamatória. Também se verifica que o peróxido de hidrogênio e o ânion superóxido atuam como mediadores mitogênicos de vias de sinalização de receptores de fatores de crescimento. Fatores de crescimento podem induzir a produção de ERO, as quais, por sua vez, ativam vias de sinalização intracelular – por meio da ativação de proteínas tirosina quinase e pela inibição de proteínas tirosina fosfatase – e regulam a expressão de genes sensíveis ao balanço redox intracelular.[32,33]

ASSOCIAÇÕES ENTRE POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO, INFLAMAÇÃO E ASPECTOS NUTRICIONAIS

A produção de mediadores inflamatórios difere bastante entre os indivíduos. Um dos fatores que pode explicar tal diferença é a variabilidade genética.[34] Como exemplo disso, observam-se diferenças importantes na concentração sanguínea de citocinas envolvidas na inflamação, como a IL-10 e o TNF-alfa, entre indivíduos saudáveis sem parentesco.[35] Por outro lado, entre gêmeos monozigóticos, a concentração dessas citocinas está bastante correlacionada,[34] reforçando a importância dos aspectos genéticos.

Uma vez que o genótipo parece influenciar de maneira significativa a produção de mediadores inflamatórios, há grande interesse em compreender de que forma fatores nutricionais interagem com o genótipo do indivíduo para modular sua resposta inflamatória, o que poderia contribuir para a redução do risco e o controle de doenças. A maioria dos estudos investiga o papel de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP, *single nucleotide polymorphism*) em genes diretamente relacionados com a síntese de mediadores inflamatórios, como aqueles que codificam citocinas. Neste tópico, serão abordados alguns desses exemplos, especificamente de SNP em genes que codificam o TNF-alfa, a IL-6, a IL-1beta e a IL-10. Para cada uma das quatro citocinas, será feita uma breve contextualização de sua função, serão discutidos os SNP mais estudados nesses genes e as evidências sobre a sua funcionalidade (p. ex., capacidade de alterar a expressão da citocina). Ademais, serão apresentadas evidências sobre a interação entre esses SNP e aspectos nutricionais na modulação da resposta inflamatória.

Cabe salientar que a resposta inflamatória é um fenômeno extremamente complexo. Diversas outras vias não relacionadas direta ou indiretamente com a inflamação podem modular a expressão de mediadores inflamatórios, o que torna ainda mais desafiador o estudo da relação entre nutrição e genética nesse contexto. Além disso, a influência do genótipo dos indivíduos sobre a resposta inflamatória é dependente da ação conjunta de variantes genéticas que interagem entre si e com o ambiente. A maioria dos SNP comuns na população, quando avaliados isoladamente, tem efeito nulo ou modesto sobre o fenótipo. Desse modo, o estudo de SNP isolados, abordagem ainda predominante nos estudos de interação genes-nutrição, não é suficiente para a compreensão da relação entre nutrição, genes e inflamação.

Por fim, é importante destacar que, apesar das evidências de que o genótipo possa interferir na relação entre resposta inflamatória e aspectos nutricionais, esse campo de estudo é bastante recente. Portanto, é crucial que os resultados sejam replicados em estudos independentes e com rigor metodológico elevado para que se possa compreender o papel da interação entre fatores nutricionais e genéticos na inflamação e no processo saúde-doença.

Fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa)

A importância do TNF-alfa no processo inflamatório fez com que essa citocina se tornasse uma das mais estudadas no contexto de doenças infecciosas e autoimunes. Aliado a isso, a atuação do TNF-alfa no metabolismo de lipídios, no processo de coagulação sanguínea, na sensibilidade à insulina e na função endotelial destaca a importância dessa citocina no desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV). Macrófagos e monócitos são os principais produtores de TNF-alfa, mas outros tipos

celulares também têm a capacidade de expressar essa citocina, como linfócitos T, adipócitos e células epiteliais. A regulação da produção de TNF-alfa é complexa e ocorre em diversas etapas, que englobam desde a modulação da expressão do gene até mecanismos de *feedback* negativo.[2]

O gene que codifica o TNF-alfa está localizado no cromossomo 6, na região do MHC classe III. Tal região é bastante polimórfica e contém diversos outros genes envolvidos na resposta imunológica. Dentre os diferentes polimorfismos identificados no gene do TNF-alfa ou em regiões próximas a ele, os mais estudados são SNP na região regulatória, particularmente o SNP -308 G>A (rs1800629).[36]

A substituição da base nitrogenada G pela A na posição -308 parece modificar a capacidade de ligação de fatores nucleares, porém não há evidências claras de que o SNP tenha efeito sobre a expressão do gene ou sobre a concentração circulante de TNF-alfa e de outros marcadores inflamatórios.[36] Em uma metanálise de estudos com base em genes candidatos, observou-se que o SNP -308 G>A estava positivamente associado a alguns fenótipos de risco para DCV, como obesidade, pressão arterial sistólica e insulinemia de jejum,[37] o que não foi encontrado em estudos de associação ampla do genoma (GWAS, *genome-wide association studies*).[38] Outra metanálise não encontrou associação entre o SNP -308 G>A e a ocorrência de eventos cardiovasculares, como doença cardíaca isquêmica ou acidente vascular encefálico (AVE) isquêmico, exceto em populações asiáticas, em que o SNP esteve associado com menor risco de AVC.[39]

Poucos estudos investigaram a interação entre a alimentação e o SNP -308 G>A na modulação da resposta inflamatória. Em homens e mulheres espanhóis com síndrome metabólica (idade de 20 a 75 anos), o genótipo GG associou-se com maior concentração de PCR. Contudo, após o consumo de dieta mediterrânea pelo período de um ano, a diferença na concentração de PCR em função dos genótipos deixou de ser significativa.[40] Em contrapartida, não foi observada interação entre a presença do SNP e intervenções nutricionais, como o consumo de dieta hipocalórica, por espanhóis obesos (80% de mulheres; idade média: 46 anos)[41] ou o aconselhamento nutricional para brasileiros com intolerância à glicose/síndrome metabólica (67% de mulheres; idade média: 57 anos)[42] sobre a concentração de marcadores inflamatórios (PCR, IL-6 e TNF-alfa).

Em relação ao efeito de suplementos nutricionais, observou-se que carreadores do alelo A referente ao SNP -308 G>A apresentaram maior redução da produção de TNF-alfa em resposta à suplementação de óleo de peixe (6 g/dia por 12 semanas) em uma amostra de homens jovens americanos com idade média de 28 anos[43] ou de vitamina E (182 mg/dia de alfa-tocoferol por um ano) em uma amostra de ingleses idosos (56% de mulheres; idade média de 83 anos).[44] Todavia, é necessário que esses resultados sejam replicados em estudos maiores e mais robustos para que se possa avaliar a consistência dessas evidências e seu significado para a prática clínica.

Interleucina 6 (IL-6)

A IL-6, originalmente denominada fator de diferenciação de células B, é atualmente reconhecida por sua atuação pleiotrópica. Essa citocina tem papel fundamental na regulação da resposta inflamatória aguda e também está envolvida na patogênese de doenças imunológicas e inflamatórias crônicas. Diferentes tipos celulares podem secretar IL-6, como células endoteliais, queratinócitos, osteoblastos, miócitos, adipócitos, células beta pancreáticas, monócitos, macrófagos, entre outros. A IL-6 liga-se ao seu receptor, IL-6R, na membrana de hepatócitos e em células do sistema imune, e inicia uma cascata de reações que culmina na produção de mediadores inflamatórios e de proteínas de fase aguda, como o fibrinogênio e a PCR.[45] O polimorfismo Asp358Ala (rs2228145) no gene do IL-6R resulta em prejuízo na função desse receptor e, portanto, em menor resposta celular ao estímulo promovido pela IL-6. Indivíduos carreadores do alelo variante em relação a esse polimorfismo têm menor risco de desenvolver doença arterial coronariana[46] e diabete tipo 1,[45] reforçando o envolvimento da IL-6 no processo inflamatório presente em diferentes doenças crônicas.

O gene que codifica a IL-6 localiza-se no cromossomo 7. Entre os polimorfismos mais estudados em relação à regulação da transcrição da IL-6, destaca-se o SNP -174 G>C (rs1800795), localizado na região regulatória do gene. Tal SNP é encontrado em populações de ancestralidade europeia, mas não em populações africanas e asiáticas. Os primeiros estudos sugeriram que a troca da base nitrogenada G pela C reduzia a expressão de IL-6 em resposta ao estímulo com IL-1beta ou LPS e resultava em menores concentrações circulantes de IL-6.[47] Contudo, esses resultados não foram consistentes em estudos subsequentes, o que torna inconclusiva a evidência sobre a importância do SNP -174 G>C na regulação da expressão do gene da IL-6.[36] Da mesma forma, estudos iniciais apontaram que esse polimorfismo estaria associado ao índice de massa corporal (IMC) e a doenças crônicas, como diabete e DCV, porém metanálises e GWAS não confirmaram esses resultados.[38]

Estudos que promoveram a ingestão de dieta mediterrânea em população espanhola[48] ou que utilizaram estratégias de aconselhamento nutricional em brasileiros[42] com elevado risco cardiometabólico indicaram que o efeito dessas intervenções sobre a produção de mediadores inflamatórios (p. ex., IL-6, molécula de adesão

intercelular-1 [ICAM-1], TNF-alfa e proteína C reativa) foi independente do genótipo do SNP -174 G>C.

Interleucina 1 beta (IL-1beta)

Assim como o TNF-alfa e a IL-6, a IL-1beta desempenha papel central na regulação da resposta inflamatória e imunológica. Essa citocina regula a produção de diversos mediadores inflamatórios, como IL-6, ICAM-1 e E-selectina. A família da IL-1 compreende nove genes localizados no cromossomo 2, dentre os quais os genes da IL-1alfa, da IL-1beta e do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1RN). Dois SNP na região regulatória do gene têm recebido destaque na literatura científica: o -511 C>T (rs16944) e o -31 T>C (rs1143627). Esses SNP estão em forte desequilíbrio de ligação ($R^2 = 0{,}94$ na população CEU – *Utah Residents with Northern and Western Europe Ancestry* – do HapMap), o que torna difícil estudar o efeito de um SNP isolado do outro. Entretanto, há evidências de que o SNP -31 T>C esteja associado à menor expressão de IL-1beta.[36]

Os estudos que avaliaram a relação de SNP no gene da IL-1beta ou em regiões próximas a ele com fatores nutricionais são escassos, o que limita a interpretação da relevância desses polimorfismos na relação entre nutrição e doenças. Estudos observacionais relataram que SNP no gene da IL-1beta podem estar associados à ocorrência de fenótipos relacionados com a síndrome metabólica em indivíduos caucasianos com menores concentrações de ácidos graxos ômega-3 (ácidos eicosapentaenoico [EPA] e docosaexaenoico [DHA]) (52% de mulheres; idade média: 49 anos)[49] e em asiáticos com menores concentrações de betacaroteno (68% de mulheres; idade média: 58 anos).[50] Aliado a isso, um estudo de intervenção apontou que o efeito de um suplemento rico em compostos bioativos com ação anti-inflamatória sobre a concentração circulante de proteína C reativa e de IL-1beta variou de acordo com o genótipo no *locus* do gene da IL-1beta em adultos americanos saudáveis e não fumantes.[51]

Interleucina 10 (IL-10)

A IL-10 atua na inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias e, portanto, tem papel crítico na regulação da resposta imune. Diversos polimorfismos foram descritos na região regulatória do gene, como: -1082 G>A (rs1800896), -819 C>T (rs1800871) e -592 C>A (rs1800872). Esses SNP estão em forte desequilíbrio de ligação em populações de ancestralidade europeia e dão origem a três haplótipos (GCC, ACC e ATA). A concentração sanguínea de IL-10 é maior entre indivíduos que apresentam o genótipo GCC.[36]

A alimentação e o estilo de vida são importantes determinantes de neoplasia colorretal. A inflamação crônica é um dos potenciais mecanismos que explicam a relação entre a alimentação e a doença. Em razão das propriedades anti-inflamatórias e antiangiogênicas da IL-10, surgiram hipóteses de que SNP funcionais na região do gene da IL-10 podem ser importantes modificadores de efeito da relação entre alimentação e câncer de cólon e reto. Nesse contexto, um estudo caso-controle apontou que o baixo consumo de fibras alimentares (< 17 g/dia) aumentou o risco de câncer colorretal apenas em indivíduos carreadores do alelo A do SNP -592 (rs1800872) em uma amostra de dinamarqueses (45% de mulheres; idade média: 57 anos).[52]

INFLUÊNCIAS DE PADRÕES ALIMENTARES E DE SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL NA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

Dieta mediterrânea, inflamação e expressão gênica

O termo "dieta mediterrânea" normalmente remete ao padrão alimentar de diferentes países localizados na costa do Mar Mediterrâneo. Não há uma definição universal para a dieta mediterrânea e diferentes estudos apropriam-se do termo sem estabelecer critérios claros e objetivos para defini-la. De modo geral, a dieta mediterrânea tradicional caracteriza-se por consumo elevado de alimentos de origem vegetal, como hortaliças, frutas, castanhas, cereais integrais e azeite de oliva; por baixa ingestão de carne vermelha e por consumo moderado de produtos lácteos e de álcool, principalmente o vinho, durante as refeições. O consumo de peixes costuma ser moderado, variando em função da distância em relação ao mar. A dieta mediterrânea é uma das dietas contemporâneas mais estudadas e sobre a qual se tem o maior corpo de evidências de efeitos benéficos à saúde.

Já na década de 1960, observou-se que a taxa de mortalidade era menor em populações de países mediterrâneos, como Grécia e Itália, em comparação a outros países europeus ou aos Estados Unidos.[53] Posteriormente, estudos observacionais indicaram que a adesão ao padrão alimentar mediterrâneo está inversamente relacionada à ocorrência de doenças crônicas, como DCV, diabete tipo 2 e alguns tipos de câncer.[54]

O estudo Predimed ("Prevención con dieta mediterranea") é o maior ensaio clínico até o momento, em que foram recrutados 7.447 indivíduos com o objetivo de avaliar o efeito em longo prazo do consumo da dieta mediterrânea sobre a prevenção primária de DCV em indivíduos com risco elevado (presença de diabete tipo 2 ou de três fatores de risco cardiovascular, como hipertensão

arterial, concentrações elevadas de lipoproteína de baixa densidade [LDL], concentrações reduzidas de lipoproteína de alta densidade [HDL], excesso de peso, tabagismo ou história familiar de DCV precoce). Nesse estudo, foram avaliados três grupos: um grupo foi incentivado a consumir dieta pobre em lipídios (grupo de referência) e os outros dois foram incentivados a consumir dieta mediterrânea suplementada com azeite de oliva extravirgem (50 mL) ou castanhas (30 g/dia). As recomendações para consumo de dieta mediterrânea envolviam aumentar o consumo de hortaliças (≥ 2 porções/dia) e frutas (≥ 3 porções/dia), castanhas, peixes ou frutos do mar (≥ 3 porções/semana), reduzir o consumo de carnes vermelhas e de produtos processados à base de carne e usar azeite de oliva nas preparações.[55] Os grupos que consumiram a dieta mediterrânea tiveram redução de cerca de 30% no risco de DCV em comparação ao grupo de referência (após cerca de cinco anos).[56] A intervenção também reduziu o risco de diabetes.[57]

Os benefícios da dieta mediterrânea à saúde vascular estão relacionados à melhora em fatores de risco clássicos, como redução da pressão arterial, melhora do controle glicêmico e do perfil lipídico, mas também modulação de outros fatores de risco, como o estresse oxidativo e a inflamação. No estudo Predimed, em apenas três meses de intervenção, observou-se redução da concentração sanguínea de IL-6 e das moléculas de adesão celular vascular (VCAM-1) e ICAM-1 nos dois grupos que consumiram dieta mediterrânea, e redução na concentração sanguínea de proteína C reativa apenas no grupo que consumiu dieta mediterrânea suplementada com azeite de oliva. Em contrapartida, no grupo de referência (dieta pobre em lipídios), observou-se aumento da concentração de VCAM-1 e de ICAM-1 após três meses do início do estudo.[58] O efeito anti-inflamatório do padrão alimentar mediterrâneo foi acompanhado por redução na expressão de CD49b em linfócitos T periféricos e de CD11b, CD49b e CD40 em monócitos, cujas moléculas são cruciais para a interação de leucócitos com outras células.[59] A modulação do processo inflamatório foi ainda mais pronunciada após um ano da intervenção: os grupos que consumiram a dieta mediterrânea tiveram reduções de 35 a 40% na concentração de PCR, de 90 a 95% na concentração de IL-6 e de 19 a 20% na concentração de P-selectina.[60]

O efeito anti-inflamatório da dieta mediterrânea reflete uma combinação complexa entre práticas alimentares, alimentos, nutrientes e compostos bioativos. Há poucos estudos sobre o efeito global da dieta mediterrânea na expressão de genes relacionados à inflamação. Contudo, alguns alimentos que a compõem, como o azeite de oliva extravirgem, têm sido extensamente estudados. A exemplo disso, tem-se demonstrado que o consumo de azeite de oliva extravirgem reduz a expressão de genes em células mononucleares de indivíduos com síndrome metabólica, incluindo aqueles relacionados aos fatores de transcrição NF-kB e AP-1, MAPK, citocinas e à via do ácido araquidônico. O efeito anti-inflamatório do azeite de oliva extravirgem tem sido atribuído particularmente a compostos fenólicos, como oleuropeína e hidroxitirosol.[61]

Sensores de ácidos graxos, inflamação e expressão gênica

Sensores de ácidos graxos saturados: receptores do tipo *Toll* 4

Ácidos graxos são ácidos carboxílicos que apresentam um grupo carboxila (–COOH) ligado a uma cadeia hidrocarbonada composta de um número variável de carbonos. Ácidos graxos são classificados de acordo com sua estrutura, número de carbonos, configuração *cis* ou *trans*, e número e posição das duplas ligações, propriedades físicas e químicas que conferem funções biológicas distintas a essas moléculas. Em razão dessas diferenças estruturais, sensores de nutrientes específicos são necessários para detectar variações na concentração dos diversos tipos de ácidos graxos.[62]

Ácidos graxos saturados como o palmítico (16:0) e o esteárico (18:0) são encontrados abundantemente no organismo humano, respondendo por aproximadamente metade dos ácidos graxos encontrados no plasma. Concentrações elevadas desses ácidos graxos, em função do consumo exacerbado de alimentos de origem animal e/ou da alta velocidade de síntese endógena, estão associadas com ganho de peso, inflamação e desenvolvimento de DCV e alterações metabólicas.[63] Essas ações dos ácidos graxos saturados estão relacionadas, pelo menos em parte, com a capacidade dessas moléculas de interagir e ativar receptores de membrana TLR4.[63, 64] A ativação de TLR4 provoca resposta imune potente que inclui a ativação de diversos fatores de transcrição pró-inflamatórios, como o NF-kB e o AP-1, que, por meio do controle da expressão de diversos genes, promovem o recrutamento e a diferenciação de monócitos em macrófagos e o aumento da produção de citocinas e quimiocinas, etapas importantes na indução da resposta imune adaptativa. Evidências experimentais indicam que concentrações elevadas de ácidos graxos saturados, por meio da ativação de TLR4, podem estar diretamente envolvidas no desenvolvimento e na manutenção da inflamação crônica e de baixa intensidade e na resistência à insulina associadas à obesidade.[2] Processos inflamatórios induzem resistência à insulina por meio da ativação de várias quinases intra-

celulares, incluindo JNK, IKK beta e p70 S6 quinase 1 (S6K1), as quais inibem a ação da insulina por meio da fosforilação inibitória de resíduos de serina no IRS-1, bloqueando a transmissão do sinal desencadeado pela interação da insulina com seu receptor.[2, 65]

Sensores de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3: PPAR e GPR

Os ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 (n-3) são ácidos graxos essenciais, isto é, não são sintetizados endogenamente em mamíferos em razão da ausência das enzimas delta 12 e 15 dessaturases, as quais catalisam a inserção de uma dupla ligação nas posições n-3 e n-6 da cadeia carbônica dessas moléculas. Os principais ácidos graxos n-3 são o EPA (20:5 n-3) e o DHA (22:6 n-3), encontrados principalmente em peixes que vivem em água fria.[65] Ao contrário dos saturados, a ingestão de alimentos ricos em ácidos graxos n-3 está diretamente relacionada com menor incidência de condições metabólicas, como obesidade, diabete tipo 2 e DCV.[65] Os mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos protetores dos ácidos graxos n-3 ainda não foram completamente elucidados; entretanto, evidências recentes apontam que essas ações estão associadas às propriedades anti-inflamatórias desses ácidos graxos. Sensores de nutrientes detectam alterações na disponibilidade de ácidos graxos n-3, como os fatores de transcrição denominados receptores ativados por proliferação de peroxissomos (PPAR) e os receptores de membrana acoplados à proteína G 120 (GPR120), que serão discutidos em detalhes.

Os ácidos graxos ômega-3 são ligantes fracos naturais que possuem a capacidade de interagir e ativar os PPAR,[66] receptores nucleares que controlam a transcrição de diversos genes por meio da heterodimerização obrigatória com o receptor X de retinoides (RXR) e da interação com sequências específicas na região promotora dos genes responsivos ao PPAR denominadas de elemento de resposta ao PPAR (PPRE).[67] São membros dessa subfamília os PPAR alfa, PPAR beta/delta e PPAR gama; este último apresenta as isoformas 1 e 2 derivadas do mesmo gene por meio da ativação diferencial do promotor e do *splicing* alternativo de RNA mensageiro. Os três membros que compõem a subfamília PPAR são expressos diferencialmente nos diversos tecidos corporais.[68-70]

O PPAR alfa é expresso principalmente no fígado, onde modula positivamente a capacidade oxidativa e neoglicogênica e, negativamente, a síntese e secreção de triacilglicerol. O PPAR beta/delta é expresso ubiquamente em diversos tecidos corporais, regulando principalmente a oxidação de ácidos graxos. Já o PPAR gama é expresso principalmente no tecido adiposo branco e marrom, células dendríticas, macrófagos, neurônios, células endoteliais e cardiomiócitos. No tecido adiposo, o PPAR gama é essencial para a diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos maduros, além de controlar a expressão de proteínas envolvidas no metabolismo de lipídios, incluindo captação, ativação, esterificação, lipólise, reciclagem e oxidação dos ácidos graxos.[71]

A ativação do PPAR gama induz resposta anti-inflamatória caracterizada pela inibição do NF-kB e, assim, da expressão e da secreção de diversas adipocinas/citocinas pró-inflamatórias, como leptina, TNF-alfa e IL-6, bem como pelo aumento da secreção de adiponectina, uma importante adipocina anti-inflamatória. A ativação do PPAR gama reduz também a atividade da iNOS, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, reduzindo a produção de NO, um importante mediador inflamatório relacionado com o desenvolvimento da resistência à insulina associada à obesidade.[67] Em conjunto, esses dados indicam que pelo menos parte das ações anti-inflamatórias dos ácidos graxos n-3 possam ser mediadas pela ativação do PPAR gama.

GPR120 são receptores de membrana acoplados à proteína Gq, amplamente expressos em adipócitos, macrófagos localizados no tecido adiposo e fígado (células Kupffer) e células enteroendócrinas L. Esses receptores, caracterizados como órfãos (seus ligantes endógenos ainda não foram descobertos), quando ativados por ácidos graxos n-3 EPA e DHA, promovem inibição potente da resposta pró-inflamatória induzida pelo TNF-alfa e por LPS. Mecanisticamente, o GPR120 inibe a resposta celular pró-inflamatória induzida pelo TNF-alfa e por LPS por meio da interação com a proteína adaptadora citosólica denominada beta-arrestina 2, a qual inibe a quinase 1 ativada por fator de crescimento beta (TAK1), uma proteína essencial para a ativação das vias pró-inflamatórias IKKbeta/NF-kB e JNK/AP1 (Figura 19.3). É importante destacar que estudos *in vivo* em camundongos constataram que os efeitos protetores dos ácidos graxos n-3 contra o desenvolvimento da inflamação crônica e de baixa intensidade associada à obesidade são abolidos na ausência dos receptores GPR120.[72] Em conjunto, esses dados indicam que os sensores de ácidos graxos n-3 GRP120 participam ativamente das ações anti-inflamatórias desses nutrientes.

Aminoácidos, inflamação e expressão gênica

O sistema mais bem caracterizado de sensibilidade aos aminoácidos é o da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), uma serina-treonina quinase extremamente conservada durante a evolução que controla a síntese proteica, o metabolismo, o crescimento e a proliferação celular. A mTOR é o núcleo catalítico de dois complexos

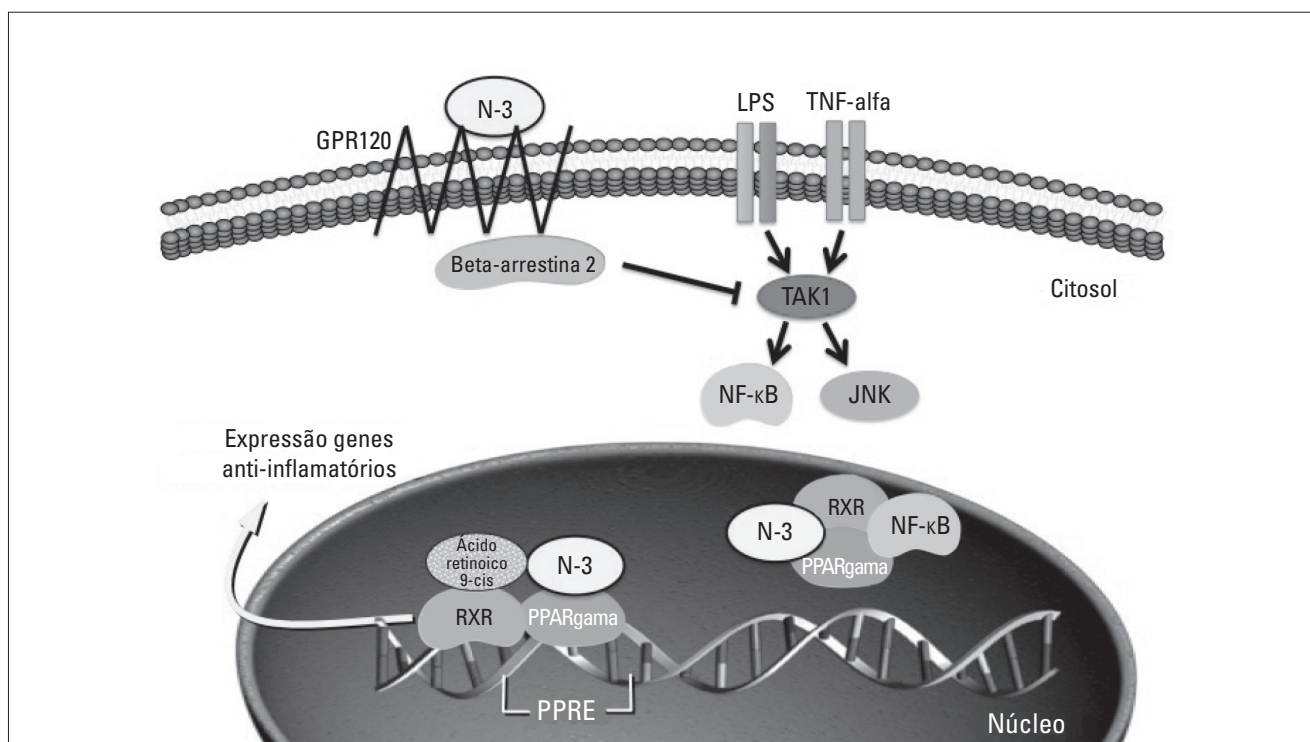



Figura 19.3 Inibição da sinalização pró-inflamatória do NF-kB pelos ácidos graxos ômega 3 (n-3). GPR120: receptor acoplado à proteína G 120; JNK: janus quinase; LPS: lipopolissacarídeo; NF-kB: fator nuclear kappa B; PPARgama: receptor ativado por proliferador de peroxissomos gama; PPRE: elemento de resposta ao PPAR; RXR: receptor do ácido retinoico; TAK1: quinase ativada pelo fator de transformação do crescimento beta; TNF-alfa: fator de necrose tumoral alfa. **Fonte:** adaptada de Oh et al.[72]

multiproteicos distintos, complexos 1 e 2 da mTOR (mTORC1 e mTORC2, respectivamente), que possuem funções biológicas, substratos distintos e sensibilidade diferente à inibição pela rapamicina.[73,74] Entre esses complexos, apenas o mTORC1 tem a capacidade de detectar alterações na disponibilidade de aminoácidos, principalmente os de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina).[73] O mecanismo molecular exato envolvido na ativação do mTORC1 por aminoácidos ainda não foi completamente caracterizado, mas parece envolver a translocação desse complexo do citosol para os lisossomos e a interação com proteínas denominadas Rag (*recombination-activating genes*).[73] Após ativação, o mTORC1 promove, por meio da fosforilação de diversas proteínas, efeitos biológicos importantes, como a síntese de proteínas, de lipídios e de nucleotídeos, além de inibir a autofagia. O mTORC1 também controla a atividade de fatores de transcrição, como o fator induzido pela hipóxia 1 (HIF-1), a proteína de ligação ao elemento regulado por esteroides (SREBP) e os PPAR, modulando assim a transcrição gênica de proteínas importantes das vias glicolíticas e lipogênicas.[73,74]

Estudos de metabolômica que encontraram concentrações plasmáticas elevadas de aminoácidos de cadeia ramificada em indivíduos obesos e diabéticos, em conjunto com resultados de aumento da atividade do complexo 1 da mTOR no fígado, no músculo esquelético e no tecido adiposo de indivíduos obesos e com resistência à insulina, indicam possível envolvimento da via aminoácidos/mTORC1 no desenvolvimento dessas condições clínicas.[75,76]

Mais especificamente, a ativação crônica da via mTORC1/S6K1 está associada com o desenvolvimento da resistência à insulina por um mecanismo de *feedback* negativo, no qual o substrato de mTORC1/S6K1, quando ativo, fosforila resíduos de serina do IRS-1, bloqueando a sua ativação e, consequentemente, a ativação da via da PI3K/Akt pela insulina (Figura 19.4).[76] Além da resistência à insulina, o mTORC1 está também envolvido no desenvolvimento da inflamação crônica de baixa intensidade associada à obesidade. A ativação de vias pró-inflamatórias por ácidos graxos saturados, pelo TNF-alfa ou pelo LPS está associada com o aumento da atividade do mTORC1 em diversos tipos celulares, como adipócitos, hepatócitos e macrófagos.[77] A função exercida por esse complexo no desenvolvimento de processo inflamatório, entretanto, ainda precisa ser mais bem elucidada.

Glicose, inflamação e expressão gênica

A glicose é o principal nutriente utilizado para produção de energia em humanos, especialmente no sistema nervoso central e nos eritrócitos, cujos metabolismos dependem quase exclusivamente desse metabólito.

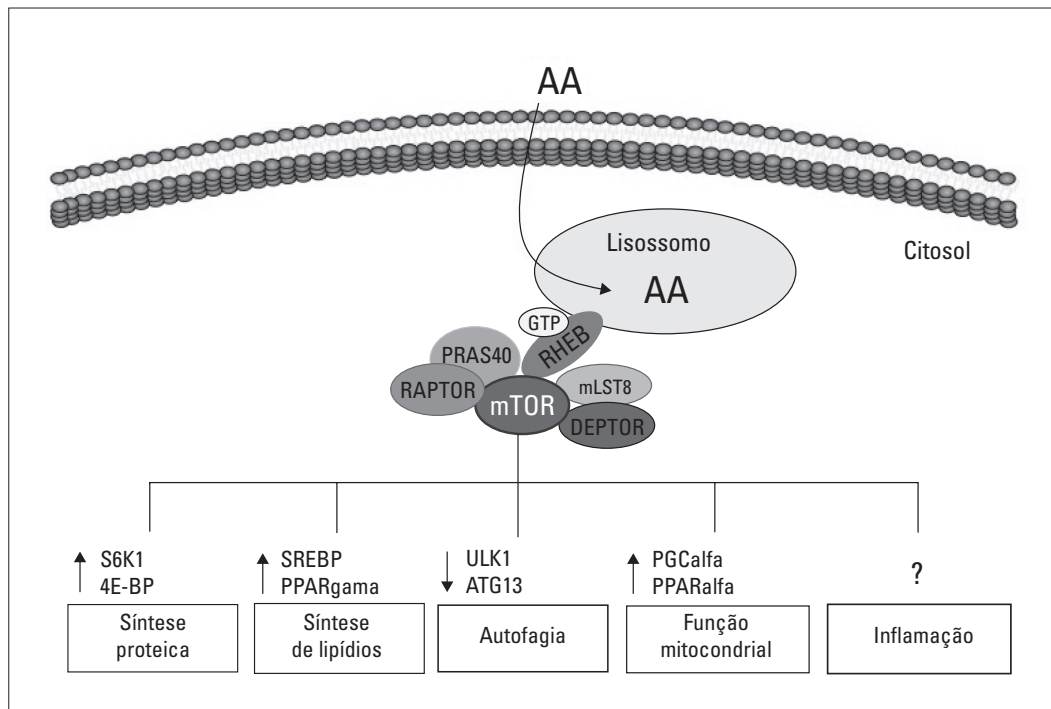



Figura 19.4 Funções biológicas do sensor de aminoácidos (AA) mTOR. 4E-BP: proteína 1 de ligação ao eIF4E; ATG13: proteína relacionada a autofagia 13; DEPTOR: proteína com domínio DEP associada a mTOR; mLST8: proteína letal de mamíferos com Sec13 8; mTOR: proteína alvo da rapamicina em mamíferos; PGCalfa: coativador dos PPAR alfa; PPARalfa: receptor ativado por proliferador de peroxissomos alfa; PPARgama: receptor ativado por proliferador de peroxissomos gama; PRAS40: substrato da AKT (proteína quinase B) rico em prolina 40; RAPTOR: proteína regulatória associada a mTOR; RHEB: proteína homóloga a RAS enriquecida no cérebro; S6K1: quinase p70 S6; SREBP: proteína de ligação ao elemento regulado por esteroides; ULK1: quinase ativadora da autofagia similar a Unc51.

Em razão de sua importante função energética, existem diversos sensores de glicose situados em várias regiões do organismo que detectam variações na disponibilidade desse açúcar e atuam com o objetivo de manter seu fornecimento adequado para atender às necessidades energéticas celulares. As células alfa e beta pancreáticas são os sensores de glicose mais estudados. Essas células secretam glucagon e insulina em resposta à hipo e à hiperglicemia, respectivamente. Esses hormônios modulam vias de produção e utilização de glicose com o objetivo de manter a glicemia dentro de valores adequados. A manutenção de altas concentrações de glicose (hiperglicemia) por período prolongado – uma das principais características do diabete e da síndrome metabólica – promove danos aos diversos tipos celulares, resultando em aumento da produção de proteínas inflamatórias e de ERO, formação de produtos finais de glicação avançada (AGE) e ativação de isoformas da proteína quinase C.[5] Além do mais, concentrações elevadas de glicose promovem fluxo metabólico exacerbado na via das hexosaminas, evento associado ao desenvolvimento de resistência à insulina em células e tecidos. Diversos sensores de glicose foram caracterizados nas últimas décadas com funções biológicas distintas. A seguir serão discutidos aspectos relativos ao principal sensor de glicose intracelular: a proteína quinase ativada por AMP (AMPK).

Glicose e AMPK

A AMPK é uma proteína heterotrimérica citosólica composta de subunidades alfa catalíticas com atividade serina-treonina quinase, e subunidades beta e gama regulatórias. A atividade da AMPK aumenta drasticamente quando ocorre a fosforilação do aminoácido treonina (na posição 172) de sua subunidade alfa, por ação da quinase supressora de tumor LKB1, o que ocorre após mudança conformacional da AMPK induzida pela interação alostérica com o AMP.[78]

Alterações na concentração de glicose modulam indiretamente a atividade da AMPK por meio de alterações na proporção AMP:ATP, isto é, disponibilidade reduzida de glicose aumenta a proporção AMP:ATP, promovendo a ativação da AMPK, enquanto o oposto também é verdadeiro. Quando ativada, a AMPK estimula vias catabólicas de produção de energia e inibe vias anabólicas. Alguns efeitos clássicos da AMPK são:

- Aumento da captação de glicose pela ativação dos transportadores de glicose 1 e 4 (GLUT1 e GLUT4).
- Elevação da glicólise.
- Incremento da captação e oxidação de ácidos graxos (beta-oxidação).

- Aumento da biogênese mitocondrial pela ativação do coativador alfa de PPAR (PGC-alfa), um corregulador da atividade de diversos fatores de transcrição.[79]

Entre os processos anabólicos inibidos pela AMPK estão a síntese *de novo* de ácidos graxos e triacilgliceróis e a síntese de glicogênio e de RNA ribossômico (Figura 19.5). Muitos desses efeitos da AMPK são mediados pela alteração da atividade de fatores de transcrição importantes, como SREBP-1, PGC-alfa, CRTC2 (um coativador do fator de transcrição CREB, ativado por AMP cíclico), proteína de ligação ao elemento responsivo a carboidratos (ChREBP) e de histonas desacetilases (HDAC), os quais promovem alterações importantes na expressão de genes envolvidos nos processos metabólicos mencionados.[78] A AMPK também está envolvida no controle da função imune, apresentando potente atividade inibidora do desenvolvimento de processos inflamatórios. A ativação farmacológica da AMPK está associada com redução da resposta pró-inflamatória induzida pelo TNF-alfa, pelo interferon gama (IFN-gama) e por LPS.[79] Os mecanismos que determinam a resposta anti-inflamatória desencadeada pela AMPK ainda não foram completamente elucidados, mas parecem envolver a ativação do metabolismo oxidativo e a repressão da glicólise aeróbia, eventos metabólicos envolvidos com a ativação e a polarização de macrófagos para o fenótipo pró-inflamatório M1.

Figura 19.5 Funções biológicas do sensor de energia AMPK. AMP: monofosfato de adenosina; ATP: trifosfato de adenosina; AMPK: proteína quinase dependente de AMP; CPT1: carnitina palmitoil transferase; NF-kB: fator nuclear kappa B; PGC-alfa: coativador alfa dos PPAR; PPAR-alfa: receptor ativado por proliferador de peroxissomos alfa; ULK1 e 2: quinases 1 e 2 ativadoras da autofagia similares a Unc51. **Fonte:** adaptada de Hardie et al.[78] e Hardie.[80]

Curcumina, inflamação e expressão gênica

A curcumina, um membro da família dos compostos curcuminoides, é um pigmento fenólico de cor amarela obtido a partir da cúrcuma (*Curcuma longa* L.), pertencente à família da *Zingiberaceae*. Sua atividade antioxidante tem sido atribuída aos seus grupos hidroxil e metóxi (Figura 19.6). Um típico extrato cru dos rizomas da *C. longa* contém cerca de 70 a 76% de curcumina. A curcumina apresenta ação anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral, antifúngica e antitumoral.[81]

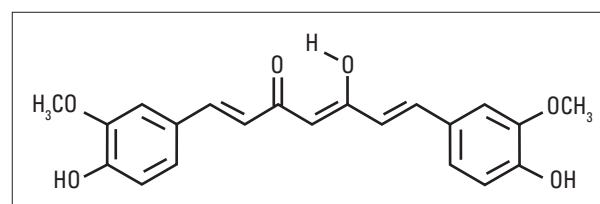



Figura 19.6 Estrutura da curcumina.

A curcumina modula diversos alvos moleculares *in vitro*, incluindo o NF-kB, e a expressão dos genes induzida

por esse fator de transcrição, como aqueles que codificam as proteínas COX-2, iNOS, VCAM-1, ICAM-1, TNF-alfa, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 e IFN-gama. Além disso, ela inibe, *in vitro,* a ativação do NF-kB dependente de TNF-alfa, bem como a ativação induzida por forbol-12-acetato-13-miristato (PMA) e por peróxido de hidrogênio. Esses três indutores estimulam a produção de ERO, as quais são potentes ativadoras do NF-kB.[82] Desse modo, sugere-se que o efeito anti-inflamatório da curcumina se deva, em parte, à sua capacidade de "sequestrar" ERO em situações de estresse oxidativo celular.

Ela é capaz de inibir a fosforilação e a degradação do IkB-alfa induzida pelo TNF-alfa, bem como a ativação do fator de transcrição AP-1, frequentemente associado à resposta inflamatória.[82] Em ensaios *in vitro*, a curcumina efetivamente inibe a ativação da JNK em células estimuladas por TNF-alfa, radiação ionizante e PMA. Esse fato revela um dos possíveis mecanismos de supressão das vias de sinalização da AP-1 e do NF-kB por esse composto.[83]

Catequinas, inflamação e expressão gênica

As catequinas pertencem ao grupo dos flavonoides, a mais abrangente categoria dentro dos compostos fenólicos. As principais catequinas são epicatequina (EC), epigalocatequina (EGC), epicatequina-3-galato (ECG) e epigalocatequina-3-galato (EGCG) (Figura 19.7). As catequinas estão amplamente distribuídas nos alimentos. A EC pode ser encontrada principalmente na fava, no chocolate e em frutas como maçã, amora, cereja, uvas escuras, peras e framboesas. EGC, ECG e EGCG são encontradas principalmente no chá-verde e, em menor extensão, no chá-preto.

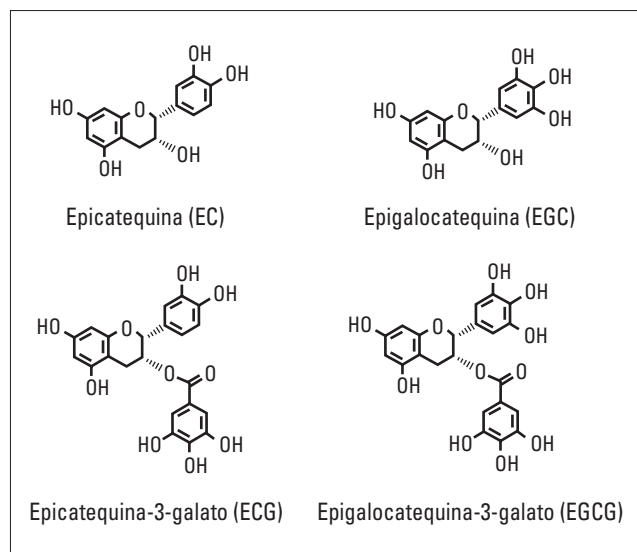



Figura 19.7 Estrutura das principais catequinas. **Fonte:** Williamson e Manach.[84]

Em diversos tipos de culturas celulares, as catequinas, em especial a EGCG, inibem a síntese de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1beta e o TNF-alfa, aumentam a síntese da citocina anti-inflamatória IL-10, reduzem a expressão das enzimas iNOS e COX-2 e inibem a produção de MCP-1 e de VCAM-1, envolvidas na migração e na infiltração de células do sistema imune no endotélio vascular – etapas fundamentais para o desenvolvimento da aterosclerose. A ação anti-inflamatória da EGCG *in vitro* tem sido atribuída, principalmente, à inibição do NF-kB.[85]

Cabe destacar que as evidências dos estudos *in vitro* sobre os efeitos anti-inflamatórios das catequinas devem ser interpretadas com cautela. De modo geral, os estudos que observaram efeito anti-inflamatório das catequinas usaram doses suprafisiológicas desses compostos, as quais não podem ser obtidas por meio da alimentação. Além disso, as catequinas, assim como outros compostos fenólicos, são extensamente metabolizadas no trato gastrintestinal e convertidas em outros tipos de metabólitos antes de atingirem a circulação sanguínea.[86]

Em animais consumindo ração hiperlipídica, a ingestão de extrato de chá-verde (400 mg/kg de peso, por oito semanas), via gavagem, resultou em redução da expressão de proteínas que regulam a ativação do NF-kB, como TLR4, MyD88 e TRAF6, assim como na diminuição da expressão de TNF-alfa no tecido adiposo mesentérico.[87] Observou-se também que a EGCG administrada via intraperitonial atenuou os efeitos adversos da ração hiperlipídica sobre o tecido hepático, principalmente pela redução da ativação do NF-kB e da via PI3 K/Akt/FoxO1, importantes reguladores do processo inflamatório e da fibrose que ocorrem na esteatose hepática não alcoólica.[88] O efeito anti-inflamatório da EGCG também foi relatado para outros tipos de modelos experimentais de condições crônicas, como diabete tipo 2, artrite reumatoide, envelhecimento, aterosclerose e hipertensão arterial.[89]

Estudos em seres humanos que avaliaram o efeito da ingestão de catequinas sobre a resposta inflamatória são escassos e, de modo geral, não corroboram com os achados dos estudos *in vitro*. Em curto prazo (até duas horas após sua ingestão), o consumo de 6 g de chá-verde por indivíduos saudáveis (64% de homens; idade média de 30 anos) não afetou a concentração sanguínea de biomarcadores inflamatórios, como proteína C reativa, IL-1beta e IL-6.[90] Ainda, a ingestão de chá-verde, durante quatro semanas, não teve efeito sobre a concentração sanguínea de mediadores inflamatórios, como PCR, IL-1beta e IL-6 e TNF-alfa, sVCAM-1 e sICAM-1, em indivíduos tabagistas,[91] com síndrome metabólica[92] ou com diabete tipo 2.[93, 94] Por outro lado, o consumo de chá-verde com conteúdo elevado de catequinas (580 mg/dia, por

duas semanas) resultou em redução da concentração circulante de PCR e MCP-1 em indivíduos tabagistas.[95]

A Tabela 19.1 apresenta diferentes compostos bioativos de alimentos envolvidos na modulação da resposta inflamatória.

MicroRNA, inflamação e obesidade

Os microRNA (miR) são uma classe de RNA pequenos (20 a 23 nucleotídeos), endógenos, fita simples, não codificantes e altamente conservados, que regulam a expressão gênica e a tradução de RNA mensageiros (RNAm). Estudos têm evidenciado o papel dos miR na iniciação e progressão do câncer, bem como a sua função fisiológica na resposta imune e inflamatória e na proliferação e morte celular, as quais são reguladas pelo fator de transcrição NF-kB. Conforme pode ser observado na Figura 19.8, diversos miR estão envolvidos na inibição e na ativação da via de sinalização do NF-kB.

A hipertrofia e a hiperplasia do tecido adiposo são associadas com anormalidades intracelulares relacionadas à função dos adipócitos, as quais podem ser induzidas por alterações no perfil de expressão de miR. Nesse sentido, constata-se que os miR-130b e miR-210 apresentam expressão reduzida durante a diferenciação de adipócitos em indivíduos magros e obesos, enquanto os miR-100, miR-125b, miR-221 e miR-222 têm aumento da expressão em indivíduos obesos e redução da expressão em indivíduos magros.[101] Por outro lado, miR-103, miR-107, miR-143 e miR-185 são induzidos em adipócitos de indivíduos magros, porém apresentam redução da expressão em indivíduos obesos. O miR-34a apresenta maior expressão durante a adipogênese, sendo essa expressão positivamente associada com o IMC. No tocante à regulação da resposta inflamatória, verifica-se que o TNF-alfa induz a redução da expressão do miR-103 e do miR-143, o que prejudica a formação de adipócitos metabolicamente ativos e completamente diferenciados.[102]

O prejuízo da função dos adipócitos está associado com o estresse do retículo endoplasmático e da função mitocondrial, os quais agravam a disfunção dessas células. Tal fato provoca o aumento da síntese de citocinas pró-inflamatórias e a redução da síntese de adiponectina. Nesse contexto, verifica-se que o miR-21 inibe a via de sinalização do TGF-beta, que, por sua vez, inibe a adipogênese e o aumento da resposta inflamatória. Além disso, macrófagos progressivamente infiltram o tecido adiposo de indivíduos obesos, o que contribui para o aumento da produção de diferentes mediadores com ação pró-inflamatória e, consequentemente, para o quadro de inflamação crônica e de baixa intensidade.[103] MiR-155, miR-183 e miR-872 induzem estresse oxidativo, inflamação e apoptose por inibirem a heme oxigenasse 1 (HO-1), enquanto o miR-221 e o miR-222 correlacionam-se positivamente com a expressão do TNF-alfa e negativamente com a expressão da adiponectina. Além

Tabela 19.1 Compostos bioativos de alimentos envolvidos na modulação da resposta inflamatória

Compostos bioativos	Fontes alimentares	Efeito na resposta inflamatória
Resveratrol	Uvas (*Vitis vinifera*)	↓ COX-2, ↓iNOS, ↓ JNK, ↓ MEK, ↓ NF-kB, ↓ AP-1, ↓ PKC, ↓ 5-LOX, ↓IL-6, ↓ IL-8, ↓ IL-1, ↑ Nrf2, ↓ VCAM-1
Curcumina	Cúrcuma (*Curcuma longa*)	↓ NF-kB, ↓ AP-1, ↑ PPAR gama, ↑ Nrf2, ↓ JNK, ↓ PKC, ↓ VCAM-1, ↓ 5-LOX, ↓ COX-2, ↓iNOS, ↓ TNF-alfa, ↓IL-6, ↓ IL-8, ↓ IL-12, ↑ GPx
Catequinas (EGCG)	Chá-verde e chá-preto	↓ NF-kB, ↓ IL-1beta, ↓ IL-10, ↓ TNF-alfa, ↓ iNOS, ↓ COX-2, ↓ MCP-1, ↓ ICAM-1, ↓ VCAM-1, ↓ PCR
Genisteína	Soja (*Glycine max*)	↓ NF-kB, ↑ GPx
Quercetina	Frutas cítricas, maçã	↓ NF-kB
Sulforafano	Crucíferas	↓ NF-kB
Capsaicina	Pimenta vermelha (*Capsicum annum*)	↓ NF-kB
Indol-3-carbinol	Crucíferas	↓ NF-kB
Ácido elágico	Romã (*Punica granatum*)	↓ NF-kB, ↓ COX-2, ↓ MMP-9
6-Gingerol	Gengibre (*Zingiber officinale*)	↓ TNF-alfa, ↓ NF-kB, ↓ AP-1, ↓ COX-2, ↓ iNOS, ↓ p38MAPK

5-LOX: 5-lipoxigenase; AP-1: proteína ativadora-1; COX-2: ciclo-oxigenase 2; GPx: glutationa peroxidase; ICAM-1: molécula de adesão intracelular 1; IL: interleucina; iNOS: óxido nítrico sintase induzível; JNK: Jun N-terminal quinase; MEK: proteína quinase quinase ativada por mitógeno; MCP-1: proteína quimiotática para monócitos 1; MMP-9: metalopeptidase de matriz 9; NF-kB: fator nuclear kappa B; Nrf2: *nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*; p38MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno p38; PCR: proteína C reativa; PKC: proteína quinase C; PPAR-gama: receptor ativado por proliferação de peroxissomos gama; TNF-alfa: fator de necrose tumoral alfa; VCAM-1: molécula de adesão celular vascular 1. **Fonte:** adaptada de Rahman et al.[81], Kang et al.[96], Park et al.[97], Kasinski et al.[98], Pae et al.[99] e Aggarwal e Shishodia.[100]

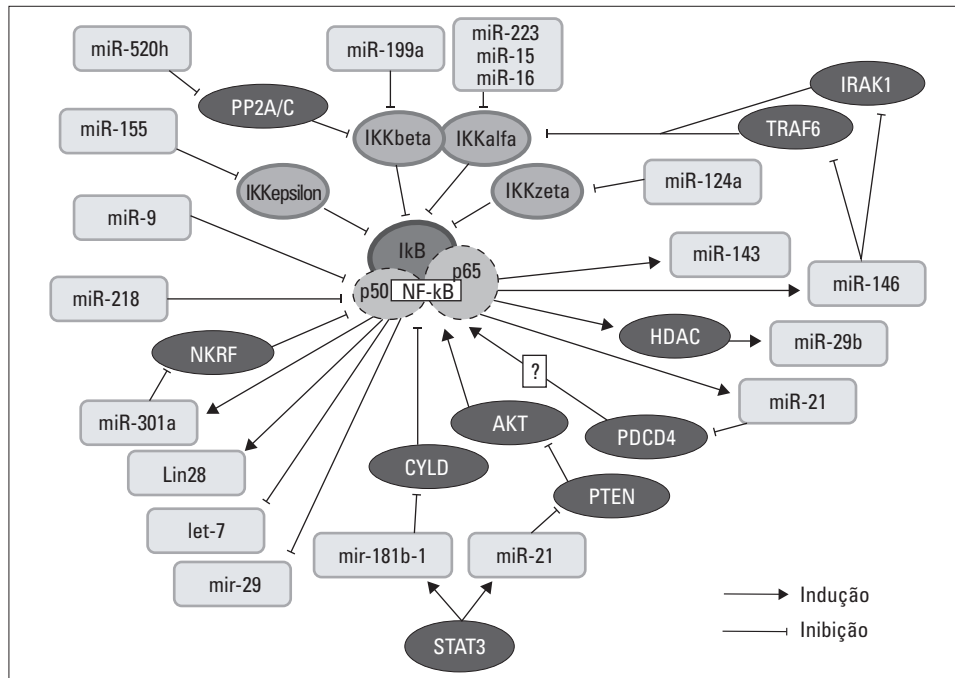



Figura 19.8 Regulação da via de sinalização do NF-kB por microRNA (miR). AKT: proteína quinase B; CYLD: hidrolase carboxiterminal de ubiquitinas; HDAC: desacetilase de histonas; IKK: quinase do inibidor do kB; IRAK1: quinase 1 associada ao receptor de interleucina 1; NKRF: fator de repressão do NF-kB; PDCD4: proteína de morte celular programada 4; PP2A/C: proteína fosfatase 2; PTEN: homólogo de fosfatase e angiotensina; STAT3: sinal de transdução e ativador de transcrição 3; TRAF6: fator 6 associado ao receptor de TNF. **Fonte:** adaptada de Ma et al.[104]

disso, o miR-132 contribui para o fenótipo pró-inflamatório e para a infiltração de macrófagos por meio da ativação da via de sinalização do fator de transcrição NF-kB em adipócitos.[105]

A hipóxia induzida pela hipertrofia do tecido adiposo branco provoca aumento da síntese de citocinas pró-inflamatórias e da expressão do miR-27, o qual está associado com prejuízo da diferenciação adipogênica. Tal fato contribui para o desenvolvimento da resistência à insulina e do diabete tipo 2. Aliado a esse fato, constata-se que o miR-320 apresenta maior expressão em adipócitos resistentes à ação da insulina, enquanto a inibição de sua expressão acarreta melhora da sensibilidade à insulina por meio da ativação da via de sinalização insulina-PI3K. O miR-17-5p e o miR-132 melhoram a sensibilidade à insulina, uma vez que a sua expressão no tecido adiposo está inversamente relacionada ao quadro de hiperglicemia e resistência à insulina.[106]

Diferentes miR regulam processos essenciais durante o desenvolvimento da aterogênese. Os miR-10a, miR21, miR124a, miR125a/b, miR-126, miR146a, miR155, miR221 e miR-222 estão associados com disfunção endotelial e adesão e infiltração de células inflamatórias no espaço subendotelial. Além disso, miR-9, miR-17, miR20a, miR106a, miR-155, miR-222, miR424 e miR-503 estão envolvidos na diferenciação de monócitos, enquanto os miR-9, miR-155, miR-33, miR-125a, miR-146a e miR-146b estão envolvidos na formação de células espumosas.[107]

A ativação de macrófagos na parede vascular é caracterizada pelo aumento da expressão de receptores TLR, os quais provocam a liberação de citocinas com ação pró-inflamatória e a captação de lipídios, bem como ativam células envolvidas com a imunidade adquirida. No tocante à regulação exercida por miR, verifica-se que o miR146a/b inibe a síntese da IRAK-1 e do TRAF-6, enquanto a expressão do miR-155 é induzida por diversos ligantes do TLR.[108] Além disso, macrófagos ativados expressam receptores do tipo *scavenger*, os quais promovem a internalização de partículas de LDL oxidada. O aumento desse processo acarreta a formação de células espumosas, as quais contêm alto teor de lipídios. A LDL oxidada induz a expressão de diversos miR (miR-9, miR-125a, miR-146a, miR146b e miR-155) em monócitos humanos. Cabe destacar que o miR-155 reduz significativamente a captação de LDL oxidada por meio da redução da síntese de receptores do tipo *scavenger* (LOX-1, CD36 e CD68), ao mesmo tempo em que inibe a liberação de diversas citocinas com ação pró-inflamatória, incluindo IL-6, IL-8 e TNF-alfa.[109]

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas últimas décadas, temos observado uma revolução na compreensão da influência dos alimentos e de seus componentes (nutrientes e compostos bioativos) sobre processos fisiológicos e patológicos. Atualmente,

reconhece-se que os nutrientes e os compostos bioativos dos alimentos são importantes sinalizadores celulares que regulam de forma integrada processos extremamente complexos, como a resposta inflamatória. Sabe-se também que há diferenças importantes entre os indivíduos no que se refere à resposta inflamatória e que parte dessas diferenças está relacionada a fatores genéticos. Desse modo, o entendimento do papel dos nutrientes na modulação da resposta inflamatória e de como essa relação pode ser modificada pela constituição genética individual pode trazer importantes contribuições para a redução do risco e para o tratamento de doenças. Contudo, é relevante destacar a importância de novos estudos que possibilitem melhor compreensão, em termos clínicos e de saúde pública, da interação entre aspectos nutricionais e genéticos e seus efeitos sobre a saúde.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brody T. Nutritional biochemistry. 2.ed. San Diego: Academic Press; 1999.
2. Hotamisligil GS, Erbay E. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. Nat Rev Immunol. 2008;8:923-34.
Peters VA, Joesting JJ, Freund GG. IL-1 receptor 2 (IL-1R2) and its role in immune regulation. Brain Behav Immun. 2013;32:1-8.
3. Sun S, Ji Y, Kersten S et al. Mechanisms of inflammatory responses in obese adipose tissue. Annu Rev Nutr. 2012;32:261-86.
4. Calder PC, Albers R, Antoine JM et al. Inflammatory disease processes and interactions with nutrition. Br J Nutr. 2009;101(Suppl. 1):S1–S45.
5. Calder PC, Ahluwalia N, Brouns F et al. Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. Br J Nutr. 2011;106:S1-S78.
6. Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. Nat Immunol. 2005;6:1191-97.
7. Kalupahana NS, Moustaid-Moussa N, Claycombe KJ. Immunity as a link between obesity and insulin resistance. Mol Aspects Med. 2012;33:26-34.
8. Conde J, Scotece M, Gomez R et al. Adipokines: biofactors from white adipose tissue. A complex hub among inflammation, metabolism, and immunity. Biofactors. 2011;37:413-20.
9. Tsan MF, Gao B. Endogenous ligands of Toll-like receptors. Journal of Leukocyte Biology. 2004;76:514-19.
10. Mushegian A, Medzhitov R. Evolutionary perspective on innate immune recognition. Journal of Cell Biology. 2001;155:705-10.
11. Kawai T, Akira S. Pathogen recognition with Toll-like receptors. Current Opinion in Immunology. 2005;17:338-44.
12. Fujihara M, Muroi M, Tanamoto K, Suzuki T, Azuma H, Ikeda H. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. Pharmacology & Therapeutics. 2003;100:171-94.
13. Liou HC. Regulation of the immune system by NF-kappaB and IkappaB. Journal of Biochemistry and Molecular Biology. 2002;35:537-46.
14. Hoebe K, Jiang Z, Georgel P, Tabeta K, Janssen E, Du X et al. TLR signaling pathways: opportunities for activation and blockade in pursuit of therapy. Current Pharmaceutical Design. 2006;12:4123-34.
15. Beutler B, Jiang Z, Georgel P, Crozat K, Croker B, Rutschmann S et al. Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large. Annual Review of Immunology. 2006;24:353-89.
16. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature. 1997;388:394-97.
17. Dobrovolskaia MA, Vogel SN. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. Microbes and Infection. 2002;4:903-14.
18. Hoebe K, Jiang Z, Tabeta K, Du X, Georgel P, Crozat K et al. Genetic analysis of innate immunity. Advances in Immunology. 2006;91:175-226.
19. Beutler B, Rietschel ET. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. Nature Reviews Immunology. 2003;3:169-76.
20. Triantafilou M, Triantafilou K. The dynamics of LPS recognition: complex orchestration of multiple receptors. Journal of Endotoxin Research. 2005;11:5-11.
21. Landmann R, Muller B, Zimmerli W. CD14, new aspects of ligand and signal diversity. Microbes and Infection. 2000;2:295-304.
22. Triantafilou M, Triantafilou K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. Trends in Immunology. 2002;23:301-04.
23. Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. Nature Reviews Immunology. 2002;2:725-34.
24. Beutler B. Innate immunity: an overview. Molecular Immunology. 2004;40:845-59.
25. Caamano J, Hunter CA. NF-kappaB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. Clinical Microbiology Reviews. 2002;15:414-29.
26. Hatada EN, Krappmann D, Scheidereit C. NF-kappaB and the innate immune response. Current Opinion in Immunology. 2000;12:52-58.
27. Magnani M, Crinelli R, Bianchi M, Antonelli A. The ubiquitin-dependent proteolytic system and other potential targets for the mo-dulation of nuclear factor-kB (NF-kB). Current Drug Targets. 2000;1:387-99.
28. Li J, Yin Q, Wu H. Structural basis of signal transduction in the TNF receptor superfamily. Adv Immunol. 2013;119:135-53.
29. Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ. Williams hematology. 6.ed. London: McGraw-Hill; 2001.
30. Beutler B, Cerami A. Cachectin (tumor necrosis factor): a macrophage hormone governing cellular metabolism and inflammatory response. Endocr Rev. 1988;9:57-66.
31. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. Philadelphia: WB Saunders Company; 2011.
32. Mattila JT, Thomas AC. Nitric oxide synthase: non-canonical expression patterns. Front Immunol. 2014;5:478.
33. Förstermann U1, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. Eur Heart J. 2012;33(7):829-37.
34. Westendorp RG et al. Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. Lancet. 1997;349(9046):170-73.
35. Van Der Linden MW et al. Determination of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-10 production in a whole blood stimulation system: assessment of laboratory error and individual variation. Journal of Immunological Methods. 1998;218(1-2):63-71.
36. Smith AJP, Humphries SE. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. Cytokine & Growth Factor Reviews. 2009;20(1):43-59.
37. Sookoian SC, Gonzalez C, Pirola CJ. Meta-analysis on the G-308A tumor necrosis factor alpha gene variant and phenotypes associated with the metabolic syndrome. Obesity Research. 2005;13(12):2122-31.

38. Hindorff L et al. A catalog of published genome-wide association studies. Disponível em: www.genome.gov/gwastudies. Acesso em: 12 dez. 2014.
39. Pereira TV et al. Effect of the G-308A polymorphism of the tumor necrosis factor alpha gene on the risk of ischemic heart disease and ischemic stroke: a meta-analysis. American Heart Journal. 2007;153(5):821-30.
40. Gomez-Delgado F et al. Polymorphism at the TNF-alpha gene interacts with Mediterranean diet to influence triglyceride metabolism and inflammation status in metabolic syndrome patients: From the Cordioprev clinical trial. Molecular Nutrition & Food Rese-arch. 2014;58(7):1519-27.
41. De Luis DA, Aller R, Izaola O, Sagrado MG, Conda R. Influence of G308A promoter variant of tumor necrosis factor-alpha gene on insulin resistance and weight loss secondary to two hypocaloric diets: a randomized clinical trial. Archives of Medical Research. 2009;40(1):36-41.
42. Curti MLR, Pires MM, Barros CR, Siqueira-Catania A, Rogero MM, Ferreira SRG. Associations of the TNF-alpha-308 G/A, IL6-174 G/C and AdipoQ 45 T/G polymorphisms with inflammatory and metabolic responses to lifestyle intervention in Brazilians at high cardiometabolic risk. Diabetology & Metabolic Syndrome. 2012;4:49.
43. Grimble RF et al. The ability of fish oil to suppress tumor necrosis factor alpha production by peripheral blood mononuclear cells in healthy men is associated with polymorphisms in genes that influence tumor necrosis factor alpha production. American Journal of Clinical Nutrition. 2002;76(2):454-59.
44. Belisle SE et al. Polymorphisms at cytokine genes may determine the effect of vitamin E on cytokine production in the elderly. Journal of Nutrition. 2009;139(10):1855-60.
45. Ferreira RC et al. Functional IL6R 358Ala allele impairs classical il-6 receptor signaling and influences risk of diverse inflammatory diseases. Plos Genetics. 2013;9(4).
46. Swerdlow DI et al. The interleukin-6 receptor as a target for prevention of coronary heart disease: a mendelian randomisation analysis. Lancet. 2012;379(9822):1214-24.
47. Fishman D et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. Journal of Clinical Investigation. 1998;102(7):1369-76.
48. Corella D et al. Polymorphisms cyclooxygenase-2 -765G>C and interleukin-6 -174G>C are associated with serum inflammation markers in a high cardiovascular risk population and do not modify the response to a Mediterranean diet supplemented with virgin olive oil or nuts. Journal of Nutrition. 2009;139(1):128-34.
49. Shen J et al. Interleukin1beta genetic polymorphisms interact with polyunsaturated fatty acids to modulate risk of the metabolic syndrome. Journal of Nutrition. 2007;137(8):1846-51.
50. Yanagisawa A et al. Possible protective effect of serum beta-carotene levels on the association between interleukin-1B C-31T polymorphism and hypertension in a Japanese population. Clinical Nutrition. 2009;28(2):198-202.
51. Kornman K et al. Interleukin-1 genotype-selective inhibition of inflammatory mediators by a botanical: a nutrigenetics proof of concept. Nutrition. 2007;23(11-12):844-52.
52. Andersen V et al. Interaction between interleukin-10 (IL-10) polymorphisms and dietary fibre in relation to risk of colorectal cancer in a Danish case-cohort study. BMC Cancer. 2012;12:183.
53. Keys A et al. The diet and 15-year death rate in the seven countries study. American Journal of Epidemiology. 1986;124(6):903-15.
54. Sofi F et al. Mediterranean diet and health status: an updated meta-analysis and a proposal for a literature-based adherence score. Public Health Nutrition. 2014;17(12):2769-82.
55. Zazpe I et al. A large randomized individual and group intervention conducted by registered dietitians increased adherence to Mediterranean-type diets: the Predimed study. Journal of American Dietetic Association. 2008;108(7):1134-44.
56. Estruch R et al. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. New England Journal of Medicine. 2013;368(14):1279-90.
57. Salas-Salvado J et al. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with the mediterranean diet results of the Predimed-Reus nutrition intervention randomized trial. Diabetes Care. 2011;34(1):14-19.
58. Estruch R et al. Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors: a randomized trial. Annals of Internal Medicine. 2006;145(1):1-11.
59. Mena MP et al. Inhibition of circulating immune cell activation: a molecular antiinflammatory effect of the Mediterranean diet. American Journal of Clinical Nutrition. 2009;89(1):248-56.
60. Casas R et al. The effects of the mediterranean diet on biomarkers of vascular wall inflammation and plaque vulnerability in subjects with high risk for cardiovascular disease. A randomized trial. Plos One. 2014;9(6).
61. Camargo A, Ruano J, Fernandez JM, Parnell LD, Jimenez A, Santos-Gonzalez M et al. Gene expression changes in mononuclear cells in patients with metabolic syndrome after acute intake of phenol-rich virgin olive oil. BMC Genomics. 2010;11:253.
62. Devlin TM. Textbook of biochemistry with clinical correlations. 5.ed. New York: Wiley-Liss, 2002.
63. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. J Clin Invest. 2006;116:1793-801.
64. Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, Prada PO, Hirabara SM,
65. Calder PC. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. Am J Clin Nutr. 2006;83:1505S-1519S.
66. Calder PC. Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. J Nutr. 2012;142:592S-599S.67.
67. Heikkinen S, Auwerx J, Argmann CA. PPAR gamma in human and mouse physiology. Biochim Biophys Acta. 2007;1771:999-1013.
68. Wang L, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig EM, Blunder M, Liu X, Malainer C et al. Natural product agonists of peroxisome prolife-rator-activated receptor gamma (PPARγ): a review. Biochem Pharmacol. 2014;92(1):73-89.
69. Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, Vallier P, Frering V, Riou JP et al. Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. Diabetes. 1997;46(8):1319-27.
70. Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauça M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. Endocrinology. 1996;137(1):354-66.
71. Festuccia WT, Deshaies Y. Depot specificities of PPAR gamma ligand actions on lipid and glucose metabolism and their implication in PPAR gamma-mediated body fat redistribution. Clinical Lipidology. 2009(4):633-42.
72. Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan W et al. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. Cell. 2010;142:687-98.
73. Efeyan A, Zoncu R, Sabatini DM. Amino acids and mTORC1: from lysosomes to disease. Trends Mol Med. 2012;18:524-33.
74. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. Cell. 2012;149:274-93.

75. Newgard CB, An J, Bain JR, Muehlbauer MJ, Stevens RD, Lien LF et al. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflam--matory response. Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104:1604-09.
76. Tremblay F, Marette A. Amino acid and insulin signaling via the mTOR/p70 S6 kinase pathway. A negative feedback mechanism leading to insulin resistance in skeletal muscle cells. J Biol Chem. 2001;276:38052-060.
77. Lee DF, Kuo HP, Chen CT, Hsu JM, Chou CK, Wei Y et al. IKK beta suppression of TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis via the mTOR pathway. Cell. 2007;130:440-55.
78. Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. Nat Rev Mol Cell Biol. 2012;13:251-62.
79. O'Neill LA, Hardie DG. Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation. Nature. 2013;493:346-55.
80. Hardie DG. AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. Genes Dev. 2011;25(18):1895-908.
81. Rahman I, Biswas SK, Kirkham PA. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. Biochem Pharmacol. 2006;72(11):1439-52.
82. Hatcher H, Planalp R, Cho J, Tortia FM, Torti SV. Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials. Cell Mol Life Sci. 2008;65(11):1631-52.
83. Aggarwal BB, Yuan W, Li S, Gupta SC. Curcumin-free turmeric exhibits anti-inflammatory and anticancer activities: Identification of novel componentes of turmeric. Mol Nutr Food Res. 2013;57(9):1529-42.
84. Williamson G, Manach C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. American Journal of Clinical Nutrition. 2005;81(1 Suppl):243s-255s.
85. Singh R, Akhtar N, Haqqi TM. Green tea polyphenol epigallocatechi3-gallate: Inflammation and arthritis. Life Sciences. 2010;86(25-26):907-18.
86. Clifford MN, Van Der Hooft JJJ, Crozier A. Human studies on the absorption, distribution, metabolism, and excretion of tea polyphenols. American Journal of Clinical Nutrition. 2013;98(6):1619S-1630S.
87. Cunha CA, Lira FS, Rosa Neto JC, Pimentel GD, Souza GIH, Silva CMG et al. Green tea extract supplementation induces the lipolytic pathway, attenuates obesity, and reduces low-grade inflammation in mice fed a high-fat diet. Mediators of Inflammation. 2013;2013.
88. Xiao J et al. Epigallocatechin gallate attenuates fibrosis, oxidative stress, and inflammation in non-alcoholic fatty liver disease rat model through TGF/SMAD, PI3 K/Akt/FoxO1, and NF-kappa B pathways. European Journal of Nutrition. 2014;53(1):187-99.
89. Pae M, Wu D. Immunomodulating effects of epigallocatechin-3-gallate from green tea: mechanisms and applications. Food Funct. 2013;4(9):1287-303.
90. Alexopoulos N et al. The acute effect of green tea consumption on endothelial function in healthy individuals. European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation. 2008;15(3):300-05.
91. De Maat MPM et al. Consumption of black and green tea has no effect on inflammation, haemostasis and endothelial markers in smoking healthy individuals. European Journal of Clinical Nutrition. 2000;54(10):757-63.
92. Basu A et al. Green tea minimally affects biomarkers of inflammation in obese subjects with metabolic syndrome. Nutrition. 2011;27(2):206-13.
93. Ryu OH et al. Effects of green tea consumption on inflammation, insulin resistance and pulse wave velocity in type 2 diabetes patients. Diabetes Research and Clinical Practice. 2006;71(3):356-58.
94. Fukino Y et al. Randomized controlled trial for an effect of green tea consumption on insulin resistance and inflammation markers. Journal of Nutritional Science and Vitaminology. 2005;51(5):335-42.
95. Oyama JI et al. Green tea catechins improve human forearm endothelial dysfunction and have antiatherosclerotic effects in smokers. Circulation Journal. 2010;74(3):578-88.
96. Kang SS, Cuendet M, Endringer DC, Croy VL, Pezzuto JM, Lipton MA. Synthesis and biological evaluation of a library of resveratrol analogues as inhibitors of COX-1, COX-2 and NF-kappa B. Bioorg Med Chem. 2009;17(3):1044-54.
97. Park HJ, Jeong SK, Kim SR, Bae SK, Kim WS, Jin SD et al. Resveratrol inhibits Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide induced endothelial adhesion molecule expression by suppressing NF-kappaB activation. Arch Pharm Res. 2009;32(4):583-91.
98. Kasinski AL, Du Y, Thomas SL, Zhao J, Sun SY, Khuri FR et al. Inhibition of IkappaB kinase-nuclear factor-kappaB signaling pathway by 3,5-bis(2-flurobenzylidene)piperidin-4-one (EF24), a novel analog of curcumin. Mol Pharmacol. 2008;74(3):654-61.
99. Pae HO, Jeong SO, Kim HS, Kim SH, Song YS, Kim SK et al. Dimethoxycurcumin, a synthetic curcumin analogue with higher meta-bolic stability, inhibits NO production, inducible NO synthase expression and NF-kappaB activation in RAW264.7 macrophages activa-ted with LPS. Mol Nutr Food Res. 2008;52(9):1082-91.
100. Aggarwal BB, Shishodia S. Molecular targets of dietary agentes for prevention and therapy of cancer. Biochem Pharmacol. 2006;71(10):1397-421.
101. Ortega FJ, Moreno-Navarrete JM, Pardo G, Sabater M, Hummel M, Ferrer A et al. MiRNA expression profile of human subcutane-ous adipose and during adipocyte differentiation. PLoS One. 2010;5:e9022.
102. Xie H, Lim B, Lodish HF. MicroRNAs induced during adipogenesis that accelerate fat cell development are downregulated in obesity. Diabetes. 2009;58:1050-57.
103. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. Nat Rev Mol Cell Biol. 2009;10(2):126-39.
104. Ma X, Becker Buscaglia LE, Barker JR, Li Y. MicroRNAs in NF-kappaB signaling. J Mol Cell Biol. 2011;3(3):159-66.
105. Keophiphath M, Achard V, Henegar C, Rouault C, Clement K, Lacasa D. Macrophage-secreted factors promote a profibrotic phe-notype in human preadipocytes. Mol. Endocrinol. 2009;23;11-24.
106. Lin Q, Gao Z, Alarcon RM, Ye J, Zun Z. A role of miR-27 in the regulation of adipogenesis. Febs J. 2009;276:2348-58.
107. Prieur X, Mok CY, Velagapudi VR, Nunez V, Fuentes L, Montaner D et al. Differential lipid partitioning between adipocytes and tissue macrophages modulates macrophage lipotoxicity and M2/M1 polarization in obese mice. Diabetes. 2011;60:797-809.
108. O'Connell RM, Iaganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104:1604-09.
109. Huang RS, Hu GQ, Lin B, Lin ZY, Sun CC. MicroRNA-155 silencing enhances inflammatory response and lipid uptake in oxidized low-density lipoprotein stimulated human THP-1 macrophages. J. Investig. Med. 2010;58:961-67.

20 Obesidade

Sophie Deram
Cristiane Cominetti
Maria Aderuza Horst

INTRODUÇÃO

A obesidade é uma condição multifatorial e poligênica, considerada um dos maiores problemas de saúde pública mundial, especialmente porque está associada a uma série de complicações secundárias e comorbidades, como diabete melito tipo 2 (DM2), doenças cardiovasculares (DCV), distúrbios respiratórios do sono e câncer.[1]

A prevalência de excesso de peso e obesidade tem alcançado proporções epidêmicas no mundo todo. No Brasil, a Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2008-2009, realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e pelo Ministério da Saúde, analisou dados de 188 mil brasileiros de todas as idades e apresentou resultados confirmando que a obesidade e o excesso de peso têm aumentado rapidamente nos últimos anos, em todas as faixas etárias. Nesse levantamento, 50% dos homens e 48% das mulheres apresentaram excesso de peso, e 12,5% dos homens e 16,9% das mulheres apresentaram obesidade.[2]

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define a obesidade como o acúmulo anormal ou excessivo de gordura corporal que pode prejudicar o bem-estar e a saúde. Para fazer essa classificação, é utilizado o índice de massa corporal (IMC); valores superiores a 30 kg/m^2 caracterizam a obesidade. O IMC é definido como a massa em quilogramas dividida pelo quadrado da estatura em metros (kg/m^2). Apesar de não ser um referencial muito preciso, permite avaliação rápida da relação massa/estatura do indivíduo. A obesidade é categorizada pela OMS como uma doença, com código E66 pela Classificação Internacional de Doenças (CID), e é considerada evitável, mas de difícil tratamento quando instalada.[3]

Por muito tempo, a obesidade foi considerada simplesmente a manifestação fenotípica de um desequilíbro entre a ingestão e o gasto energético, o qual poderia ser facilmente revertido por restrição calórica e prática de exercícios físicos. Contudo, os resultados de estudos clínicos de longo prazo com base nesse pressuposto mostraram que o problema é muito mais complexo. Além disso, estudos mostram que neurocircuitos específicos envolvidos na regulação do apetite estão etiologicamente integrados ao mecanismo patológico da obesidade, sugerindo que ela deva ser considerada uma doença neurobiológica, em vez de uma simples consequência de estilo de vida e hábitos alimentares prejudiciais.[4] A questão é complicada, muito provavelmente, porque existe um conjunto de “obesidades” cuja etiologia pode ser muito diversa. Múltiplos fatores socioculturais, socioeconômicos, comportamentais e biológicos (muitas vezes inter-relacionados e muitos deles ainda desconhecidos ou mal compreendidos) podem contribuir para a ocorrência e a perpetuação de fenótipos obesos.[5]

Por outro lado, progressos significativos ocorreram nos últimos anos no sentido da compreensão da obesidade comum não sindrômica, em parte, graças aos resultados de estudos genéticos. Nesse contexto, reforça-se o ponto de vista que contradiz a antiga visão da obesidade como um distúrbio do equilíbrio energético e que a classifica como doença neurocomportamental, com influência na expressão de genes relacionados ao controle neurológico do apetite e da ingestão de alimentos, o que apresenta papel central na sua patogênese. No estudo da obesidade, além das relações determinantes entre a alimentação e o estilo de vida, há também envolvimento de mecanismos cerebrais relacionados à motivação para comer, ao controle biológico da atividade-

de física espontânea, ao possível papel da qualidade dos alimentos e dos nutrientes e compostos bioativos de alimentos (CBA), bem como a importância do ambiente nutricional na concepção e no início da vida.[6]

A alimentação foi apontada como principal fator ambiental envolvido na modulação da expressão gênica por Ordovas e Corella[6] e como um fator de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas por DeBusk et al.[7] Na última década, os estudos relacionando as interações entre genes e meio ambiente têm aumentado de maneira considerável. Nesse sentido, emerge o conceito de nutrigenômica, estudo dos efeitos da nutrição na modulação da expressão gênica, focada na interação entre nutrientes e/ou CBA e genoma. Como muitas funções celulares relacionadas à homeostase energética são reguladas pela expressão de genes e por interações entre genes e ambiente, as variações interindividuais de peso e de composição corporal, bem como as diferenças no metabolismo do tecido adiposo, podem ser influenciadas pelo perfil genético e pela ingestão de nutrientes e CBA.[8]

Este capítulo descreve as hipóteses concorrentes sobre os mecanismos subjacentes às bases genéticas e fisiológicas da obesidade e explora a ampla gama de estudos recentes sobre a associação entre fatores genéticos e obesidade, em abordagens de genes candidatos, de genoma completo, de epigenética, bem como aspectos relacionados à microbiota.

ALIMENTAÇÃO HUMANA E ASPECTOS DE GENÔMICA NUTRICIONAL

Orientações nutricionais gerais internacionais têm sido emitidas com vistas à redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis sem considerar os efeitos de variações genéticas nas respostas à alimentação, apesar de muitas evidências científicas terem emergido nas últimas décadas. Alguns dos primeiros estudos de genética e bioquímica em humanos mostraram considerável variabilidade intra e interpopulações, o que é altamente relevante para a nutrição. Diferenças nas necessidades nutricionais e nas interações entre nutrientes e características bioquímicas/metabólicas geneticamente determinadas sugerem respostas biológicas diferentes para cada indivíduo, de acordo com o perfil genético. Isso denota que os guias alimentares atuais podem ser adequados apenas para uma proporção relativamente pequena da população.[9] Mais recentemente, pesquisas em epidemiologia nutricional têm redirecionado seu foco para a avaliação do papel dos alimentos e do padrão alimentar, em detrimento de nutrientes específicos, como fatores de risco ou proteção para doenças crônicas.

Ao longo da história humana, os padrões alimentares atuaram na modificação do padrão de expressão de genes, resultando em fenótipos capazes de responder aos desafios ambientais e que permitem melhor exploração dos recursos alimentares disponíveis. Essas adaptações têm sido fundamentais para o crescimento e o desenvolvimento humano. O padrão alimentar sofreu grandes modificações nos últimos anos. Depois de milhões de anos de um provável padrão básico, uma alteração drástica ocorreu após o surgimento da agricultura, há aproximadamente 10.000 anos, e, nos últimos 50 anos, houve alterações marcantes, especialmente em função do desenvolvimento da indústria alimentícia. No entanto, a constituição genética humana, em grande parte, manteve-se praticamente inalterada.[10]

Mais recentemente, tem ocorrido grande entusiasmo em relação à genômica nutricional, provavelmente atribuído à consciência crescente do potencial da alimentação adequada em modular o padrão de expressão gênica, o que pode resultar na promoção da saúde e na redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis. Um exemplo marcante e bastante estudado é o dos índios Pima, tribo que costumava viver nas montanhas entre México e Estados Unidos. Na divisão de fronteira entre os dois países, parte dos índios permaneceu no México sem alterar seu estilo de vida ancestral, apresentando prevalência de obesidade de 13%; outra parte passou a viver em uma reserva pertencente aos Estados Unidos e alterou seus hábitos alimentares, passando a consumir uma alimentação típica americana (SAD, *standard american diet*) e a praticar menos exercícios físicos. Dessa forma, essa população passou a apresentar prevalência de obesidade de 69%. Essas observações denotam a influência do meio ambiente, uma vez que não houve mudanças genéticas.[11]

Entende-se que, com as crescentes mudanças nos hábitos alimentares, no estilo de vida e na qualidade da alimentação, as pessoas estão cada vez mais propensas a desenvolver distúrbios relacionados à alimentação. O fenótipo metabólico é influenciado pela plasticidade do desenvolvimento, determinado no início da vida, e por interações com fatores ambientais ao longo do tempo. Ao contrário do genoma humano, que é relativamente fixo e estável, o fenótipo metabólico humano é muito mais complexo e dinâmico, varia ao longo do tempo, entre as diferentes células e entre indivíduos.[8]

PESO CORPORAL

Do ponto de vista da bioquímica, o nível das reservas de lipídios nos mamíferos depende da interação entre diversos processos, incluindo o gasto de energia, o controle do comportamento alimentar, a distribuição de nutrientes entre os tecidos e em vias catabólicas ou anabólicas, e os processos de depósito de lipídios.[12]

Estudo de Bouchard[13] observou que o aumento de 1.000 kcal na alimentação de gêmeos idênticos durante três meses resultou em ganho médio de peso de 8,1 kg, porém com variação entre 4,3 e 13,3 kg entre os grupos. Os autores sugeriram o envolvimento de fatores genéticos para explicar as semelhanças intrapares com relação às variações no ganho de peso e na distribuição de gordura. Em estudo posterior, o mesmo grupo confirmou que as respostas relativas à perda de peso e às alterações da composição corporal decorrentes da prática de atividade física também foram semelhantes entre cada par de gêmeos, mas com diferenças importantes interpares.[13]

Grande parte da variabilidade do peso corporal está sob controle de genes que codificam fatores de transcrição, moléculas de sinalização e receptores relacionados à regulação da homeostase energética, da adipogênese, da deposição de gordura e da termogênese, com destaque para aqueles envolvidos no controle hipotalâmico e, portanto, na regulação do apetite e saciedade, bem como na liberação de hormônios e de outras funções celulares relacionadas com a eficiência energética.[14] Alterações nesses processos podem ser herdadas ou adquiridas como consequência de exposições ambientais, sobretudo como parte da programação do desenvolvimento no período fetal e no início da vida. É importante ressaltar que, uma vez identificados os elementos moleculares envolvidos nos processos que regulam o metabolismo da gordura corporal, estes se tornam alvos terapêuticos potenciais para o tratamento da obesidade.

Todavia, ainda se sabe relativamente pouco sobre as alterações moleculares que acompanham a perda ou a recuperação de peso corporal e como elas estão relacionadas às mudanças na taxa metabólica de repouso.[15] As alterações que ocorrem em órgãos metabólicos fundamentais, como músculo esquelético, tecido adiposo, fígado, intestino e cérebro, durante a perda e a recuperação de peso corporal, podem ser facilmente estudadas em modelos animais; porém, em seres humanos, essa abordagem é muito mais complicada. Nesse sentido, os avanços tecnológicos obtidos nas últimas décadas, especialmente em estudos de genômica nutricional, e a combinação de diferentes tecnologias, como transcriptômica e metabolômica, permitem melhorar a interpretação funcional das interações entre genótipo e ambiente.[16]

NUTRIGENÉTICA E OBESIDADE

Aspectos gerais

Em geral, as formas mais comuns de sobrepeso e obesidade observadas na população são de origem poligênica, além de envolverem interações complexas entre diferentes genes e entre genes e fatores ambientais.[17] Avanços obtidos a partir de estudos de nutrigenética baseiam-se na premissa de que a constituição genética determina necessidades nutricionais únicas. Nesse contexto, tais estudos oferecem novas possibilidades para elucidar o papel dos genes e da variabilidade genética no desenvolvimento da obesidade e para direcionar o entendimento de como modular a expressão de genes por meio da nutrição personalizada.[18]

A obesidade monogênica é uma condição muito mais rara, atribuída à mutações em poucos genes que apresentam relação determinante com a doença, como o gene da leptina (*LEP*), do receptor de leptina (*LEPR*), da pró-opiomelanocortina (*POMC*), da convertase pró-hormônio e pró-proteína tipo 1 (*PC1*) e do receptor da melanocortina-4 (*MC4R*).[19] Existem, também, mais de 30 síndromes raras associadas à obesidade causadas por defeitos genéticos discretos ou por anormalidades cromossômicas, como a síndrome de Prader-Willi, uma condição autossômica dominante que se caracteriza por obesidade, hiperfagia, hipotonia muscular, retardo mental, baixa estatura e hipogonadismo.[20]

Por outro lado, dados sobre a obesidade poligênica apoiam a hipótese de que a prevalência desse tipo de condição resultou das interações entre estilos de vida desfavoráveis e variações genéticas específicas, como os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP, *single nucleotide polymorphism*), os quais apresentam efeitos discretos, porém convergentes.[21]

Genes e suas formas variantes têm sido selecionados como candidatos para o estudo da relação com a obesidade quando se verifica que apresentam envolvimento no metabolismo ou quando se localizam em regiões cromossômicas associadas à obesidade. Entretanto, a expectativa de se encontrar um gene associado à obesidade e à sua cura reduziu gradativamente depois dos anos 2000, quando ficou clara a influência genética complexa e a constatação de que a importância de apenas uma variação no desenvolvimento da obesidade é pequena.[22]

Em revisão sobre a obesidade poligênica, Hinney e Hebebrand[23] sugerem que a predisposição genética para a obesidade envolve a presença de um conjunto de polimorfismos que foi identificado em indivíduos obesos. No entanto, a determinação de quais ou quantas variações genéticas são necessárias para resultar no fenótipo de obesidade é complicada pelo fato de que variantes que predispõem à obesidade também são encontradas em pessoas com peso normal ou inferior ao considerado eutrófico. Portanto, polimorfismos relacionados ao aumento do peso são identificados e validados por análises estatísticas que determinam quais alelos ocorrem com mais

frequência em obesos quando comparados com indivíduos não obesos. Dessa forma, conclui-se que cada variação tem apenas uma pequena contribuição para o desenvolvimento da obesidade e que essa condição é determinada pela interação entre a predisposição genética e o ambiente. Nesse sentido, mais de 500 genes e diversos marcadores genéticos envolvidos na obesidade já foram identificados.[22] Sabe-se também que pelo menos 77 *loci* são associados ao IMC[24] e que quase todos os cromossomos do genoma humano (exceto o Y) contêm pelo menos um *locus* associado à regulação do peso corporal.[25]

Alguns genes têm sido alvo de muitos estudos nos últimos anos, como o da leptina e do seu receptor; das proteínas desacopladoras (UCP 2 e 3); de moléculas envolvidas na diferenciação de adipócitos (receptores ativados por proliferador de peroxissomos – PPAR); de proteínas relacionadas com o processo inflamatório, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa); de neuropeptídeos hipotalâmicos e seus receptores (POMC, neuropeptídeo Y e receptores da melanocortina) e de receptores adrenérgicos (beta-2 e beta-3). Diante do número de genes relacionados com a obesidade e da complexidade resultante da obtenção de resultados divergentes entre populações, Rankinen et al.[25] estudaram genótipos associados positivamente à obesidade em pelo menos cinco grandes estudos e identificaram 22 genes candidatos à obesidade. A esses genes foram associados cinco fenótipos diferentes[25] (Quadro 20.1).

Em 2008, O'Rahilly e Farooqi[5] estudaram o fenótipo hiperfágico e classificaram a obesidade como doença neurocomportamental. Tal conceito emergiu a partir da descrição de que neurocircuitos específicos envolvidos na regulação do apetite são etiologicamente integrados ao mecanismo patológico que origina a obesidade, sugerindo que esta deva ser considerada uma doença neurobiológica. Além da manifestação física, um crescente corpo de evidências sugere uma relação estreita com componentes psicológicos que compreendem distúrbios de humor, percepção alterada de recompensa e motivação e, ainda, de comportamentos relacionados ao vício em certos alimentos e/ou nutrientes.[4] Nesse contexto, genes relacionados ao controle hipotalâmico da fome, do apetite e da saciedade são relacionados ao risco do desenvolvimento de obesidade.[26]

Um estudo avaliou os genes mais frequentemente associados ao acúmulo excessivo de gordura corporal e observou que variações nesses genes ou em regiões próximas a eles influenciam o controle do apetite (*CNR1, NPY, POMC, MC4R*), a regulação do metabolismo celular (*FTO, TFAPB2, TCF7L2, SCAP, DRD2*), a adipogênese e o metabolismo lipídico (*ADRB3, PPAR, APO, PLIN*), o gasto energético (*UCP*), a sinalização da insulina (*ISR-2, INSIG2, GIPR*) e as vias inflamatórias (*ADIPOQ, IL-6, RETN*). Nessa pesquisa, foram sugeridos fatores que podem explicar a genética da obesidade: os genes poupadores, a programação fetal, o estilo de vida sedentário, a etnia, a capacidade reprodutiva, o acasalamento e a complexidade da doença.[27] Nesse sentido, estudos abordando SNP em genes candidatos e a associação destes com a obesidade são conduzidos na tentativa de elucidar os mecanismos envolvidos na determinação da doença.

Quadro 20.1 Fenótipos relacionados a genes candidatos da obesidade

Fenótipo	Gene – proteína codificada
Thrifty: "poupador ou econômico" (envolvidos no gasto energético)	*ADRB2* – receptor beta adrenérgico 2 *ADRB3* – receptor beta adrenérgico 3 *UCP1* – proteína desacopladora 1 *UCP2* – proteína desacopladora 2 *UCP3* – proteína desacopladora 3
Baixa oxidação lipídica	*ACE* – enzima conversora de angiotensina ADIPOQ – adiponectina *GNB3* – proteína 3 ligadora do nucleotídeo guanina *IL-6* – interleucina 6 *INS* – insulina *LDLR* – receptor de lipoproteína de baixa densidade *LIPE* – lipase hormônio sensível *RETN* – resistina *TNF-alfa* – fator de necrose tumoral alfa
Adipogênese	*PPAR-gama* – receptor ativado por proliferador de peroxissomos gama *VDR* – receptor da vitamina D
Sedentário	*DRD2* – receptor de dopamina D2 *MC4R* – receptor de melanocortina 4
Hiperfágico (regulação da fome, apetite e saciedade)	*DRD2* – receptor de dopamina D2 *HTR2C* – receptor de 5-hidroxitriptamina *LEP* – leptina *LEPR* – receptor da leptina *MC4R* – receptor da melanocortina 4 *NR3C1* – receptor nuclear subfamília 3, grupo C, membro 1

Fonte: Rankinen et al.[25]

Principais genes candidatos envolvidos com a obesidade

Gene *FTO*

O gene *FTO* (*fat mass and obesity gene*) está localizado na região cromossômica 16q12.2 e foi o primeiro a ser relacionado a formas comuns de obesidade humana. O gene *FTO* é expresso em diferentes tecidos humanos, com as maiores quantidades de RNAm encontradas no núcleo arqueado do hipotálamo. Sua expressão é modulada pelo ciclo jejum/alimentação, o que indica envolvi-

mento funcional desse gene no controle central da homeostase energética.[28]

Três estudos de associação ampla do genoma (GWAS) independentes apontaram a importância do gene *FTO* na predisposição à obesidade.[29-31] Entre os SNP identificados, pelo menos seis são fortemente associados com a obesidade; entretanto, o que parece exercer o efeito mais relevante na determinação da doença é o rs9939609 (T>A), localizado no primeiro íntron. Tal fato foi observado em várias coortes abrangendo mais de 40 mil adultos e crianças de populações de origem caucasiana (europeia, europeia-americana e hispano-americana).[29]

Apesar de a contribuição do rs9939609 ser consistente, a presença do alelo de risco parece ter pequeno impacto; 16% dos adultos homozigotos para o alelo de risco pesavam cerca de 3 kg a mais e tinham risco 1,67 vez superior de desenvolver obesidade quando comparados aos indivíduos não carreadores do alelo de risco. De forma interessante, essas variantes do gene *FTO* parecem não influenciar o IMC e o risco de obesidade em algumas populações, como a de afro-americanos,[31] chineses Han,[32] japoneses[33] ou populações da região da Oceania (melanesianos, micronesianos e polinesianos).[34] Essas observações sugerem que as diferenças populacionais têm surgido em função das divergências evolutivas, talvez como resultado de alguma pressão de seleção negativa contra os alelos de risco do *FTO* em africanos e nas populações do leste asiático.

Embora a função do produto do gene *FTO* e as vias biológicas envolvidas ainda não estejam completamente elucidadas, a expressão desse gene ocorre em vários tecidos, incluindo o cérebro e o músculo esquelético, e provavelmente está relacionada à regulação da ingestão alimentar. Avaliando o SNP mais fortemente associado à obesidade, o rs9939609 (T>A), Karra et al.[35] identificaram que indivíduos carreadores do genótipo associado a maior risco de obesidade (AA) apresentaram supressão pós-prandial de grelina reduzida em comparação com indivíduos carreadores do genótipo TT.

Em crianças, confirmou-se que a presença do alelo A relativo ao polimorfismo rs9939609 é associada à saciedade diminuída[36] e à hiperfagia, mesmo após a refeição.[37] Um estudo identificou que o polimorfismo rs9939609 está envolvido com o comportamento alimentar em crianças na Inglaterra. Os autores apontaram que as crianças carreadoras do alelo de risco apresentavam obesidade precoce decorrente do excesso de consumo de alimentos, provavelmente em razão da menor capacidade de resposta aos sinais internos de saciedade e não em função de gasto energético reduzido.[38] Esse polimorfismo não parece influenciar o peso ao nascer, mas tal associação foi verificada em crianças brasileiras a partir de quatro anos de idade.[39]

Uma metanálise de 47 estudos com 218.166 adultos e 19.268 crianças concluiu que a associação do alelo de risco (A) do SNP rs9939609 com risco de obesidade é atenuada em 27% em adultos fisicamente ativos, destacando a importância da prática de exercícios físicos, em especial por indivíduos geneticamente predispostos à obesidade.[40]

Em 2011, um estudo mostrou que o efeito de SNP do *FTO* no risco do desenvolvimento de obesidade não é somente influenciado pelo exercício físico, mas também pela ingestão de lipídios, especialmente de ácidos graxos saturados, mas não pelo consumo de carboidratos.[41] Dessa forma, polimorfismos no *FTO*, em especial o rs9939609, parecem candidatos promissores a intervenções personalizadas visando à redução do risco de obesidade.

Receptor da melanocortina 4 (*MC4R*)

O *MC4R* tem localização cromossômica 18q22 e é expresso no centro da fome do cérebro. Consiste em um importante regulador da homeostase energética, com potencial de influenciar tanto a ingestão de alimentos quanto o gasto de energia. Mutações raras na região codificadora do *MC4R* foram associadas à obesidade grave de origem monogênica.[42]

Com relação à obesidade poligênica, foram identificados alguns polimorfismos no gene *MC4R*. Em um GWAS envolvendo inicialmente 16.876 indivíduos de ascendência europeia (sete populações diferentes), duas variantes comuns (rs17782313 [T/C] e rs17700633 [G/A]), com frequência de 24 e 30%, respectivamente, foram associadas com a adiposidade em adultos e em crianças. A replicação de tais resultados foi realizada em 60.352 indivíduos (abrangendo dez populações diferentes) e, posteriormente, em 15.878 indivíduos (provenientes do consórcio Genetic Investigation of Anthropometric Traits – Giant). Concluiu-se que a presença do alelo C, relativo ao SNP rs17782313, implica aumento de ~0,22 kg/m^2 e, a do alelo A, referente ao SNP rs17700633, embora com associação mais fraca, aumento de ~0,15 kg/m^2.[43]

Esses dados foram confirmados em revisão sistemática e metanálise com um total de 80.957 casos e 220.223 controles. Foram avaliados cinco SNP: rs17782313, rs12970134, rs571312, rs17700144 e rs4450508. O único que apresentou associação significativa com a suscetibilidade para o desenvolvimento da obesidade foi o rs17782313. A etnia parece exercer influência sobre o efeito desse polimorfismo, uma vez que foi observado efeito semelhante para europeus e asiáticos, enquanto para africanos não foi encontrada associação.[44]

Ainda com relação à obesidade poligênica, foram identificados outros polimorfismos no gene *MC4R* em

diferentes populações, sendo os mais frequentes o rs2229616 (Val103Ile) e o rs52820871 (Ile251Leu). Os alelos menos frequentes de ambos foram relacionados com redução do risco do desenvolvimento de obesidade. Entretanto, a frequência desses alelos é rara, estando presentes em cerca de apenas 5% dos indivíduos na maioria das populações avaliadas.[45, 46] Metanálise com um total de 7.713 indivíduos alemães também relatou o efeito protetor do alelo Ile do rs2229616.[47]

Apesar das evidências da associação entre SNP no *MC4R* e a obesidade, ainda não se sabe qual relação causal ou funcional leva ao desenvolvimento da doença. Alguns autores sugerem que os polimorfismos nesse gene influenciam a ingestão de alimentos e as escolhas alimentares, mas não estão relacionados ao gasto energético.[48] No entanto, outros trabalhos não encontraram associação com fatores nutricionais.[49] Portanto, mais estudos são necessários para identificar as vias biológicas pelas quais os polimorfismos do *MC4R* aumentam a suscetibilidade à obesidade.

Receptor beta adrenérgico 2 (*ADRB2*)

O *ADRB2* pertence a uma classe de receptores ativados pelas catecolaminas adrenalina (epinefrina) e noradrenalina (norepinefrina). Esses receptores são expressos em muitas células, mas principalmente no tecido adiposo branco, onde estão intimamente envolvidos na mobilização dos triacilgliceróis para geração de energia. Comparando indivíduos obesos com aqueles de peso normal, há fortes evidências de que, nos primeiros, os mecanismos adaptativos do sistema nervoso simpático poderiam estar alterados. Há mais de duas décadas especula-se que alterações nos receptores adrenérgicos poderiam diminuir a atividade simpática e, consequentemente, alterar a lipólise.[50] Em razão do papel que os receptores adrenérgicos desempenham na regulação da lipólise e do gasto energético, é biologicamente plausível que polimorfismos no *ADRB2* contribuam para a obesidade e para as alterações metabólicas que a acompanham. Alterações na função do *ADRB2* ocasionadas por SNP funcionais parecem limitar a mobilização de lipídios e favorecer o acúmulo de gordura.[51]

Entre os polimorfismos descritos no *ADRB2*, dois funcionais e comuns foram associados com o risco do desenvolvimento de obesidade, hipertensão e DM2.[52] Tais polimorfismos ocorrem nos códons 16 (Arg16Gly; rs1042713) e 27 (Gln27Glu; rs1042714) e, por resultarem em alteração da sequência de aminoácidos na extremidade N-terminal extracelular do ADRB2, podem alterar a função do receptor.[53, 54]

O polimorfismo Arg16Gly foi significativamente associado com a obesidade em adolescentes do sexo feminino, mas não do masculino, em estudo com 559 adolescentes em Taiwan. Meninas com o genótipo Gly/Gly apresentaram menor possibilidade de desenvolver obesidade e menor IMC e, além disso, foi verificada menor probabilidade de desenvolvimento de hipertensão em adolescentes obesos.[55]

Large et al.[56] investigaram na Suécia a frequência dos SNP Arg16Gly (rs1042713) e Gln27Glu (rs1042714) em 58 mulheres não obesas e em 82 mulheres obesas, utilizando como ponto de corte para obesidade o IMC de 27 kg/m^2. O polimorfismo Gln27Glu apresentou forte associação com a obesidade ($p = 0,003$); 24% das mulheres obesas eram homozigotas para o alelo Glu, enquanto apenas 3% das mulheres não obesas apresentavam esse genótipo (risco relativo ~7; *odds ratio* = 10,4). As mulheres homozigotas para o alelo Glu apresentaram IMC 7 kg/m^2 mais alto, massa adiposa 20 kg maior, adipócitos maiores, bem como concentração plasmática de insulina de jejum mais elevada e maior razão cintura:quadril em comparação às homozigotas selvagens (Gln/Gln). Não houve associação com a obesidade nas carreadoras do genótipo heterozigoto e também não foi verificada relação com o polimorfismo Arg16Gly.

Em metanálise incluindo 17 estudos com análise de 9.995 indivíduos em relação ao SNP Gln27Glu e de 7.322 indivíduos ao Arg16Gly, concluiu-se que há associação significativa do primeiro com o aumento do risco de obesidade, o que não é verificado para o polimorfismo Arg16Gly.[53]

Trabalhos indicam que a predisposição à obesidade decorrente do SNP Gln27Glu pode ser controlada por intervenções nutricionais adequadas. Em um estudo sobre a interação entre genes e nutrientes, demonstrou-se que a ingestão de carboidratos totais (> 49% do valor calórico total consumido diariamente) pode estar associada com aumento do risco para obesidade (RR = 2,56), particularmente em mulheres carreadoras do alelo Glu.[57] Outro trabalho observou interação entre o SNP Gln27Glu e mudanças no peso corporal, no IMC e na massa magra em 78 mulheres espanholas, obesas, submetidas a dietas hipocalóricas. Carreadoras do alelo Glu (em homo ou heterozigose) apresentaram maior redução de peso que as homozigotas selvagens ($9,5 \pm 2,9$ *versus* $7,0 \pm 3,5\%$, respectivamente). Entretanto, as mulheres carreadoras do alelo Glu perderam mais massa magra que as não polimórficas ($5,9 \pm 2,7$ *versus* $4,0 \pm 2,7\%$, respectivamente; $p = 0,001$).[58] Todavia, são necessários mais estudos de intervenção em diferentes populações para avaliação concreta da relação entre o polimorfismo Gln27Glu do *ADRB2*, a ingestão de carboidratos e o risco de obesidade.

Leptina (*LEP*) e receptor de leptina (*LEPR*)

A leptina (do grego *leptos*, magro) foi identificada em 1994 como um produto do gene *ob* descrito inicialmente em camundongos. A sua descoberta é considerada um marco importante em pesquisas sobre obesidade, tendo sido até mesmo aventada a possibilidade da descoberta da cura dessa doença.[59] Entretanto, muitos indivíduos obesos apresentam altas concentrações plasmáticas de leptina, com correlação positiva com a adiposidade[60] e, em pouco tempo, a teoria da cura da doença foi descartada. A leptina humana é produzida pelo gene *LEP*, localizado no cromossomo 7, e é um peptídeo formado por 167 aminoácidos. A síntese de leptina ocorre em resposta à alimentação, principalmente nos adipócitos, e as concentrações plasmáticas refletem positivamente o tamanho do tecido adiposo, informando o *status* do estoque de energia para o cérebro.[61]

A descoberta de receptores de leptina nos neurônios evidenciou que o hipotálamo é o principal alvo das ações desse hormônio na manutenção da homeostase energética. Suas ações mais importantes envolvem o controle da ingestão alimentar, a manutenção da homeostase corporal e a regulação do metabolismo de carboidratos e lipídios.[62] Para que a leptina exerça adequadamente suas funções, é necessária sua ligação com seu receptor, o LEPR.

Polimorfismos nos genes *LEP* e *LEPR* foram relacionados ao risco de desenvolvimento de obesidade. Metanálise que avaliou nove estudos que incluíram 1.235 indivíduos obesos e 1.359 controles concluiu que o genótipo AA relativo ao SNP -2548G>A (rs7799039) no gene *LEP* foi positivamente associado com obesidade em africanos.[63] Esse polimorfismo e os *LEPR* Lys109Arg (rs1137100), Gln233Arg (rs1137101) e Lys656Asn (rs8179183) foram investigados em brasileiros caucasianos de descendência europeia (87 homens e 239 mulheres – 148 obesos e 178 controles). Não foi encontrada relação entre o *LEP* -2548G>A e a obesidade; contudo, os SNP no *LEPR* foram relacionados com a doença e com alterações metabólicas. O alelo 223Arg (rs1137101) teve relação com a circunferência abdominal e a leptinemia aumentadas, ao passo que o alelo LEPR 109Arg (rs1137100) foi associado com aumento da concentração plasmática de colesterol total e triacilgliceróis. Avaliando os três SNP em conjunto, identificou-se que carreadores do haplótipo AGG: 109Lys/233Arg/656Lys (do *LEPR*) apresentaram risco aumentado para obesidade. Além disso, esse haplótipo foi associado com IMC, circunferência abdominal e leptinemia aumentados.[64]

Sugere-se que o polimorfismo -2548G>A (rs7799039) no gene *LEP* possa influenciar a síntese de leptina. Em estudos com mulheres adolescentes caucasianas europeias[65] e em chineses de ambos os sexos saudáveis ou com diabetes,[66] verificou-se que carreadores do alelo A apresentam menor síntese desse hormônio. Entretanto, observou-se que mulheres gregas homozigotas para o alelo A apresentaram maiores concentrações plasmáticas de leptina quando comparadas às carreadoras do alelo.[66] Entretanto, ainda não está clara a relação entre a concentração plasmática de leptina e o desenvolvimento ou manutenção da obesidade.

Ainda com relação ao polimorfismo -2548G>A (rs7799039) no gene *LEP*, indivíduos finlandeses homozigotos AA apresentaram maior porcentagem de gordura corporal e IMC elevado quando comparados aos indivíduos carreadores do alelo G.[68] Na população brasileira, Hinuy et al.[69] encontraram associação entre o alelo G e a obesidade. Assim, a relação desse SNP com a obesidade é dúbia, uma vez que tanto baixas quanto altas concentrações de leptina estão relacionadas com desregulação no eixo fome-apetite-saciedade, confirmando a complexidade da obesidade e sua dependência da interação entre muitos fatores ainda não completamente elucidados.

Apesar das controvérsias a respeito da relação entre a obesidade e o polimorfismo -2548G>A (rs7799039), o exercício físico tem efeito positivo na regulação da concentração plasmática de leptina, sendo capaz de reduzir a leptinemia em homozigotos selvagens (GG) e, por outro lado, de aumentá-la em homozigotos AA ou heterozigotos.[68] Esse polimorfismo também parece influenciar a resposta ao consumo de fibras alimentares sobre as concentrações sanguíneas de lipídios. Crescenti et al.[70] avaliaram 178 participantes separados em dois grupos, um placebo e outro que recebeu 14 g/dia de plantago ovata, ambos submetidos a dieta pobre em gordura saturada por oito semanas. Homozigotos GG apresentaram redução na concentração de triacilgliceróis em resposta à suplementação, o que não foi observado em carreadores do alelo A.

Limitações dos estudos de nutrigenética e obesidade

Existem muitas inconsistências nos resultados de estudos que investigam quais genes e polimorfismos estão relacionados ao risco do desenvolvimento da obesidade. Depois do anúncio dos genótipos fortemente associados com a obesidade em adultos no *Human obesity gene map: the 2005 update*,[25] a relação entre 10 SNP (rs1801282 – *PPAR-gama*), (rs5082 – *APOA2*), (rs1042714 – *ADRB2*), (rs1800206 – *PPAR-alfa*), (rs6659176 – *NROB2*), (rs5443 – *GNB3*), (rs7754561 – *ENPP1*), (rs1042713 – *ADRB2*), (rs4994 – *ADRB3*) e (rs7566605 – *INSIG2*) e obesidade não foi confirmada em 5 mil crianças (2.500 pares de gêmeos) avaliadas na Inglaterra, o que aumentou a incerteza

quanto à utilização de genes candidatos na associação com essa doença. Os autores sugerem que essa correlação possa emergir quando as crianças chegarem à adolescência e à idade adulta.[71]

É importante destacar que a influência dos polimorfismos no desenvolvimento da obesidade pode depender também do estado nutricional do indivíduo. Algumas limitações em estudos, como a ausência de controle em função do estado nutricional individual, podem resultar em associações errôneas de variações genéticas com fenótipos relacionados à obesidade. Um exemplo é o gene da perilipina 1 (PLIN1), principal proteína localizada na superfície das gotículas lipídicas em adipócitos, a qual modula o metabolismo por meio da regulação do acesso de enzimas lipolíticas como a lipase hormônio sensível (LHS), a lipase de triacilgliceróis do adipócito (ATGL) e a monoacilglicerol lipase (MGL). Essas enzimas atuam nos triacilgliceróis, liberando ácidos graxos armazenados no adipócito para serem utilizados como fonte de energia, principalmente em células musculares. Em estudo com 234 crianças e adolescentes obesos brasileiros, o SNP rs894160 (11482 G>A, intrônico) no gene PLIN1, associado ao aumento da lipólise, foi também relacionado a um efeito protetor ante o ganho de peso e o desenvolvimento da obesidade. Entretanto, esse mesmo SNP se associou a alterações metabólicas prejudiciais quando houve ganho de peso, aumentando, por consequência, o risco de síndrome metabólica.[72]

Entre as interações importantes existentes entre o genoma e o meio ambiente (principalmente a alimentação), destaca-se também a época de nascimento. Rosenquist et al.[73] demonstraram que mudanças globais no ambiente ao longo do tempo podem modificar a penetrância de fatores de risco genéticos para diversos fenótipos. Esse dado acrescenta mais uma dimensão na avaliação das interações entre genes e meio ambiente e sugere que a presença (ou ausência) de correlação genótipo-fenótipo pode depender do período em que os indivíduos nasceram ou do momento histórico em que os pesquisadores conduziram suas investigações.

O mesmo estudo foi conduzido com uma coorte do Framingham Heart Study com dados coletados ao longo de 30 anos para confirmar a associação bem documentada entre o SNP rs9939609 do *FTO* (T>A no íntron 1) e a obesidade. Observou-se associação robusta entre genótipo-fenótipo para o alelo TT e o IMC, com um ponto de inflexão observado para aqueles que nasceram depois de 1942. Assim, não houve associação entre a variante do *FTO* e o risco de obesidade nos participantes nascidos antes de 1942; todavia, naqueles que nasceram depois de 1942, observou-se associação mais forte do que havia sido estimado anteriormente, na avaliação de todos os dados sem considerar a época do nascimento. Esses resultados sugerem que influências genéticas para características complexas como a obesidade podem variar ao longo do tempo, provavelmente por causa das mudanças ambientais globais.[73]

Desafios futuros dos estudos de nutrigenética e obesidade

Os avanços tecnológicos tornaram possível a investigação não só de genes específicos, mas também a exploração de toda a sequência do genoma completo, de variantes do DNA, de transcritos, proteínas e metabólitos. Esses avanços proporcionam oportunidades de estabelecer as bases para a incorporação da individualidade biológica nas recomendações nutricionais, com potencial terapêutico significativo.

GWAS realizados por grandes consórcios internacionais estão descobrindo variantes genéticas que contribuem para a gênese de doenças complexas. No entanto, a informação sobre as interações dessas variações genéticas com nutrientes ainda é escassa, e esta é essencial para o desenvolvimento de recomendações nutricionais personalizadas a partir do genótipo individual.[9]

Um dos desafios no estudo de interações genes-nutrientes é a replicação de resultados significativos em diferentes populações, independentemente da perspectiva de pesquisa. Apenas recentemente, com os GWAS e metanálises amplas, foi possível começar a examinar as interações entre os milhões de SNP, os fatores nutricionais e as características fenotípicas de interesse. Embora a replicação de estudos sobre as interações genes-alimentação seja um passo fundamental para aumentar as evidências científicas, tais interações devem ser analisadas a partir de um ângulo mais biologicamente funcional, com abordagens de alto nível de complexidade, incluindo informações de genômica, nutrição, epigenética, microbiota e fatores comportamentais, como prática de exercícios físicos e cronotipo.[74]

Ao considerar a diversidade do genoma herdado em conjunto com a miríade de interações entre genes e alimentos ou nutrientes e CBA específicos, os conhecimentos de nutrigenética podem contribuir para o desenvolvimento da nutrição personalizada.[75] Assim, esses conhecimentos são importantes não apenas para caracterizar a influência da origem genética de um indivíduo sobre o risco de desenvolvimento de obesidade, mas também para considerar o método pelo qual as intervenções nutricionais devem ser prescritas de maneira individual.[76]

GWAS forneceram informações importantes sobre novas abordagens e sobre a biologia fundamental da obesidade. Eles também sugerem alvos potenciais para

intervenção terapêutica e para ensaios clínicos de farmacogenética. No entanto, a maioria das variantes associadas à obesidade tem efeitos modestos e representa apenas pequena proporção do total da herdabilidade do peso, destacando a necessidade de mais estudos com populações de diferentes etnias com vistas a identificar com segurança a dimensão dos efeitos esperados em doenças complexas. Além disso, sugere-se que um efeito fenotípico possa surgir apenas em combinação com outras variantes de predisposição. É pouco claro se certos conjuntos de variantes poligênicas relevantes para a obesidade em um indivíduo são os mesmos em outro indivíduo.

Como o genótipo não muda ao longo da vida, o desenvolvimento de escores de risco genéticos (GRS, *genetic risk scores*) com base em resultados de GWAS oferece potencial para a detecção precoce de indivíduos com alto risco.[77,78] Sugere-se que GRS poderiam ser úteis na identificação de pessoas que são predispostas à obesidade, e estas se beneficiariam de recomendações nutricionais personalizadas. Um exemplo é o estudo de Belsky et al.[79] no qual foi desenvolvido um GRS com 32 *loci* para obesidade a partir dos resultados de 16 estudos de GWAS em indivíduos de descendência europeia. Posteriormente, esse escore foi aplicado em uma coorte de mais de 10 mil indivíduos (77% brancos e 23% afro-americanos), sendo preditor significativo do IMC e da obesidade entre os indivíduos brancos, mas com associações mais fracas na população afro-americana.

Estudos posteriores mostraram também a importância de analisar a relação de fatores relacionados ao estilo de vida, como níveis de atividade física, os quais atenuaram os efeitos do GRS em uma população chinesa,[80] ou aspectos relacionados à alimentação, como a influência do padrão de ingestão de ácidos graxos saturados sobre os resultados de um GRS relacionado ao IMC em duas populações americanas.[81]

Goni et al.[82] realizaram estudo com o objetivo de avaliar o valor de um GRS como preditor da obesidade e as interações deste com a ingestão alimentar. Interações significativas entre o GRS e a ingestão de energia, de proteína total, de proteína de origem animal e vegetal, de gorduras totais, de ácidos graxos saturados e poli-insaturados, de carboidratos totais e complexos, e de fibra alimentar sobre características de adiposidade foram observadas após ajuste para sexo, idade, prática de exercícios físicos e ingestão energética. O estudo confirmou que o grupo com alto risco genético apresentou maior adiposidade em comparação ao grupo de baixo risco e demonstrou também que a ingestão de macronutrientes modifica a associação do GRS com características relacionadas à adiposidade.

EXPRESSÃO GÊNICA E OBESIDADE

SNP em genes relacionados à obesidade podem alterar a sequência de aminoácidos codificados, bem como a concentração e a atividade de proteínas traduzidas, modificações que também podem estar associadas a padrões alimentares distintos, os quais influenciam a suscetibilidade individual para o ganho de peso em ambientes específicos. Enquanto a maioria dos fatores ambientais é arbitrária e transitória (p. ex., tabagismo e atividade física), a alimentação é um fator ambiental essencial à vida. Interações genes-alimentação confirmam o fato de que as variações genéticas podem predispor a doenças, enquanto a alimentação pode diminuir ou exacerbar esse risco. Nutrientes e CBA comprovadamente interagem em nível molecular com o genoma e podem resultar em ações benéficas ou deletérias.[83]

Ácidos graxos, açúcares ou vitaminas, como A e D, podem ter ações nucleares diretas via interação com fatores de transcrição, ativando ou inativando a transcrição de genes. Os lipídios da alimentação têm influência na gênese da obesidade também por sua capacidade de modular a expressão de genes, pois atuam como moléculas sinalizadoras que controlam a atividade de fatores de transcrição e de receptores nucleares, o que pode resultar em alterações no metabolismo energético e na diferenciação e crescimento celular.[84] A ligação de ácidos graxos a receptores nucleares como o PPAR-gama resulta, em última instância, na expressão de genes relacionados ao metabolismo de lipídios e na modulação das vias pró-inflamatórias com papel importante na obesidade.[85]

Os carboidratos, diferentemente dos lipídios, foram quase sempre estudados como um grupo único; entretanto, os diferentes tipos apresentam destinos metabólicos distintos. Colley et al.[86] verificaram que a ingestão de glicose por ratos resultou em aumento da expressão de sete peptídeos hipotalâmicos relacionados à saciedade. De maneira interessante, os resultados não foram tão claros para outros tipos de açúcares como frutose e xarope de glicose (milho). Esses dados fornecem evidências de que nem todos os açúcares atuam da mesma forma no que diz respeito ao controle da ingestão alimentar. O consumo de frutose adicionada em alimentos tem aumentado, em paralelo à elevação na prevalência da obesidade e do DM2, o que sugere que esse açúcar, especialmente quando adicionado aos alimentos nos processos industriais, pode ser um fator predisponente à resistência à ação da insulina e ao ganho de peso.[87]

O momento da ingestão de alimentos também pode contribuir para o ganho de peso e para as doenças metabólicas, uma vez que a homeostase energética e os ritmos circadianos são molecular e fisiologicamente inter-

ligados.[88] Consequentemente, a alteração do momento da ingestão de alimentos pode interferir no estabelecimento da obesidade induzida pela alimentação. A expressão basal do gene *CLOCK* (*circadian locomotor output cycles kaput*) em tecido adiposo humano está associada com o conteúdo de gordura abdominal e com fatores de risco cardiovascular.[89] A função do sistema circadiano, incluindo componentes centrais como os fatores de transcrição CLOCK e BMAL1 e seus repressores transcricionais PER2 (*Period 2*) e CRY1/CRY2 *(cryptochrome 1/2)*, na obesidade humana tem sido demonstrada em estudos de associação entre metabolômica e SNP nesses genes.[2, 90]

EPIGENÉTICA E OBESIDADE

Existem evidências convincentes sobre o papel da epigenética na determinação da suscetibilidade à obesidade, mediando a plasticidade fenotípica durante o desenvolvimento. Padrões alimentares maternos e paternos, bem como nos primeiros anos de vida, parecem influenciar o risco de desenvolvimento de obesidade por mecanismos de *imprinting* e programação metabólica, detalhados no Capítulo 30.

A alimentação durante os primeiros anos de vida tem importância como fator determinante para o risco de desenvolvimento de doenças na vida adulta. A modulação epigenética da expressão gênica, por meio da alimentação e de fatores relacionados ao ambiente intrauterino, determina trajetórias de saúde/doença ao longo da vida. A programação no início da vida modula a expressão de genes durante o desenvolvimento e a maturidade e permite o desenvolvimento fenotípico em resposta a estímulos ambientais. O papel do ambiente adverso durante os períodos de gestação ou lactação tem sido bem documentado no desenvolvimento posterior da obesidade, sugerindo que a alimentação e o estilo de vida da mãe podem alterar a programação do desenvolvimento do feto.[91] A alimentação materna durante o desenvolvimento fetal tem muitas implicações epigenéticas que afetam os riscos para a obesidade na infância e na idade adulta, e até mesmo em gerações posteriores. Os genes associados ao risco de obesidade são suscetíveis a alterações epigenéticas aberrantes, as quais têm efeitos subsequentes sobre os mecanismos envolvidos na obesidade, como a regulação do apetite, a tolerância reduzida à glicose e a resistência à insulina.[92]

Pesquisas com animais e humanos mostram que dietas que contêm excesso ou poucas calorias durante a gestação resultam em descendentes com maior risco de desenvolver obesidade e/ou síndrome metabólica.[17] A relação entre a nutrição materna, o padrão de metilação e a obesidade foi observada em humanos, revelando descobertas interessantes e promissoras.[93]

O papel da nutrição na idade adulta também é observado e o controle epigenético da expressão gênica ganha cada vez mais importância. Tem-se demonstrado a capacidade de CBA de modular a atividade de enzimas que regulam a maquinaria epigenética.[17, 94] Suplementos de ácido fólico estão ligados à supressão de genes específicos e também à hipermetilação global do genoma (mais detalhes no Capítulo 5). Outros fatores que têm sido associados à metilação do DNA na fase adulta são o consumo de álcool e o estado nutricional do indivíduo em relação às vitaminas do complexo B, vitamina A e alguns minerais.[95]

Com relação ao consumo de lipídios, a exposição intrauterina a uma alimentação rica em lipídios pode predispor o indivíduo ao desenvolvimento de síndrome metabólica por meio de modificações epigenéticas em genes que codificam adipocitocinas, como a adiponectina e a leptina.[96]

Estudos de epigenética que incluem o padrão de metilação do DNA, as modificações em histonas e o papel dos microRNA observam que um componente substancial do risco de obesidade tem base de desenvolvimento pré-natal. Ademais, além dos testes genéticos, análises epigenéticas no período perinatal podem ter utilidade na identificação da vulnerabilidade do indivíduo para o desenvolvimento de obesidade e de outras doenças metabólicas na fase adulta.

MICROBIOTA

O interesse no estudo da microbiota intestinal humana tem aumentado nos últimos anos, uma vez que os microrganismos intestinais emergem como potenciais novos contribuintes para o aumento da prevalência da obesidade, da síndrome metabólica e do DM2. Os mecanismos pelos quais o microbioma intestinal pode influenciar o metabolismo e a homeostase energética incluem a regulação da utilização da energia proveniente da alimentação,[97] a interação com moléculas de sinalização envolvidas no metabolismo dos microrganismos, a modificação da permeabilidade intestinal, a liberação de hormônios intestinais e a inflamação crônica e de baixa intensidade característica de doenças relacionadas com a obesidade.[98]

Fatores nutricionais, como a ingestão energética, podem afetar a composição da microbiota intestinal, a qual também parece ser modulada por fatores genéticos e outros fatores ambientais. Evidências crescentes sugerem que variações em genes e no padrão de espécies do microbioma intestinal podem ajudar a definir subgrupos de indivíduos que apresentam risco aumentado de desen-

volvimento de doenças metabólicas relacionadas à obesidade, incluindo a resistência à insulina e o DM2. A maioria dos estudos observa aumento das bactérias do filo Firmicutes e redução de Bacteroidetes em indivíduos obesos;[99] entretanto, as pesquisas ainda são preliminares.

Grande parte das descobertas sobre a relação entre microbioma e obesidade é baseada em estudos com roedores. A transposição dos resultados para o ser humano requer investigações mais aprofundadas. Alterações no padrão alimentar têm sido apontadas como o fator mais importante na determinação da composição da microbiota, a qual tem sido relacionada a relevantes implicações na produção de metabólitos, na resposta inflamatória, na resistência à insulina e na obesidade. Os hormônios relacionados à microbiota e envolvidos na regulação da fome e da saciedade, como a grelina e o peptídeo YY, podem, por exemplo, responder de forma distinta a diferentes componentes alimentares, como é o caso da frutose em comparação com a glicose.[100]

Os principais desafios da ciência nessa área são determinar a compreensão adequada acerca das influências genéticas e ambientais sobre a microbiota e também das consequências das mudanças estruturais e funcionais sobre doenças metabólicas e inflamatórias. Também será importante revelar potenciais consequências das terapias antibióticas em várias idades da vida e em longo prazo, as quais podem contribuir para algumas formas de obesidade iatrogênica.

NEUROCIÊNCIA, NUTRIGENÉTICA E OBESIDADE

Em 2007, uma ampla revisão acerca de aspectos envolvidos na regulação hormonal da ingestão alimentar concluiu que "a regulação do peso corporal é um processo altamente complexo e controlado centralmente pelo cérebro".[100] Diante dessas informações, houve mudança do foco da pesquisa sobre a influência de aspectos genéticos na determinação da suscetibilidade à obesidade, com maior direcionamento para o estudo da regulação hipotalâmica da fome e da saciedade.

Em paralelo ao conhecimento do papel do equilíbrio energético na determinação do peso corporal, tem ocorrido ascensão da importância da influência neurocomportamental no desenvolvimento da obesidade, com enfoque nas alterações do controle neurológico do apetite e da ingestão de alimentos como centrais na patogênese dessa condição. Esse ponto de vista é sustentado pelo fato de que a maioria dos genes em que mutações raras resultam em obesidade monogênica está envolvida no controle do apetite por meio da via da leptina-melanocortina. Os genes envolvidos no controle da ingestão alimentar incluem aqueles que codificam receptores relacionados com a sensação do gosto ou peptídeos de sinalização periférica (insulina, leptina, grelina, colecistoquinina) e seus receptores.[100]

O tratamento da obesidade depende do entendimento de fatores genéticos e de contribuintes ambientais, o que inclui a identificação de polimorfismos específicos e a interpretação de respostas a intervenções nutricionais que podem ser afetadas por determinantes genéticos.[101] Por exemplo, indivíduos que carreiam SNP relacionados com a obesidade têm apresentado diferenças na resposta aos programas de restrição calórica, a qual pode também depender da composição global da alimentação.[15, 78, 102]

Nesse sentido, o gene *FTO* também foi associado à modulação do apetite, à hiperfagia e à baixa saciedade. Estudo de Huang et al.[103] observou que indivíduos carreadores do alelo de risco (A) relativo ao SNP rs9939609 podem obter mais benefícios em relação à redução de peso e à diminuição da compulsão alimentar e do apetite quando aderem a um padrão de alimentação hipocalórica e hiperproteica.

Recentemente, um estudo descreveu *loci* relacionados ao IMC e revelou um componente neuronal importante, envolvendo processos como a regulação do apetite. Esse estudo envolveu mais de 330 mil pessoas e destacou 97 *loci* (56 novos) com influência na determinação do peso corporal, muitos dos quais parecem funcionar alterando a forma como o apetite é regulado em nível cerebral, em vez de atuar na alteração do metabolismo basal. Variações em genes como o *NPC1* (*Niemann-Pick disease, type C1*) e o *ELAVL4* (*embryonic lethal, abnormal vision-like 4*) são consideradas fortes candidatas, bem como variações em genes relacionados ao sistema imune, como o *TLR4 (toll like receptor 4)*, parecem exercer influência sobre a obesidade por meio de alterações na microbiota.[104]

Portanto, a análise de vias metabólicas demonstra a grande importância do sistema nervoso central na suscetibilidade à obesidade e implica genes anteriormente não considerados, incluindo aqueles relacionados com a função sináptica, a sinalização do glutamato, a secreção/ação da insulina, o metabolismo energético e de lipídios e a adipogênese.

Com relação à restrição alimentar, alguns estudos descreveram efeitos positivos à saúde, como alterações no padrão de envelhecimento em animais, relacionadas, por exemplo, à menor perda de massa muscular em macacos Rhesus.[105] Por outro lado, estudos pré-clínicos e clínicos sugerem que a restrição alimentar prolongada aumenta a sensibilidade à recompensa alimentar.[106-108]

De maneira interessante, em estudo comparando as áreas do cérebro relacionadas com a recompensa de indivíduos com fome ou saciados, descobriu-se que, na

primeira situação, houve ativação mais acentuada das áreas cerebrais quando foram apresentadas imagens de alimentos com alto teor energético em comparação a imagens de alimentos pouco calóricos. Por outro lado, os indivíduos mostraram resposta mais pronunciada a alimentos menos calóricos quando saciados.[109] Esses resultados sugerem que mesmo um breve período de restrição alimentar pode predispor indivíduos a desejar alimentos com maior densidade energética. Resultados semelhantes foram observados em estudo com participantes obesos, sugerindo que esse efeito pode ocorrer independentemente do peso corporal.[110] Ambos os padrões de restrição e de excesso de energia podem ter consequências deletérias, tanto em relação à neuroquímica quanto aos comportamentos associados à recompensa e ao reforço de comportamento alimentar, provavelmente em razão de alterações dos processos neurais relacionados ao controle do apetite.

A restrição calórica pode ocasionar mudanças rápidas e profundas no metabolismo e resultar em redução da taxa de metabolismo basal,[111] na diminuição da concentração da leptina[112] e em aumento do apetite.[113] Um estudo de Sumithran et al.[114] avaliou o efeito da adaptação metabólica à perda de peso e demonstrou que houve diminuição da taxa de metabolismo basal e das concentrações de leptina, do peptídeo YY, de colecistoquinina e de insulina, acompanhada por aumento da grelina, do polipeptídeo pancreático e do polipeptídeo inibidor gástrico (GIP).

A restrição alimentar também atua na modificação da expressão dos genes relacionados ao estresse. Estudos em ratos sugerem que a restrição alimentar moderada altera a forma como o cérebro responde ao estresse e pode favorecer o ganho de peso, aumentando a produção de glicocorticoides e favorecendo comportamentos depressivos. Ratos que foram submetidos a dietas restritivas reagiram ao estresse comendo alimentos mais gordurosos. Nesse estudo, observaram-se alterações no padrão de expressão de vários genes relacionados à regulação do estresse e do apetite, as quais permaneceram mesmo após a reintrodução da ração adequada.[115] Em conjunto, esses resultados mostram como a alternância de hiperfagia e períodos de restrição alimentar pode alterar mecanismos neurais subjacentes a recompensa, aumentando potencialmente o prazer derivado do consumo de alimentos.

Já foi demonstrado, em modelos animais, que alterações nas concentrações de adipocinas relacionadas ao "efeito sanfona" agravam potencialmente o estado pró-inflamatório crônico e relacionam-se à liberação e à síntese desregulada das próprias adipocinas.[116] Nesse sentido, camundongos submetidos a tentativas repetidas de perda de peso por meio de dieta restritiva apresentaram "efeito sanfona", com maior ganho de gordura corporal. Como resultado do "efeito sanfona", o padrão de expressão dos genes *CLOCK* no tecido adiposo dos animais também foi alterado. Houve redução na expressão de vários genes relacionados ao sistema circadiano (*PAD*, *TEF*, *PER1/2/3* e *NR1D2*) no tecido adiposo, sugerindo que tais genes podem atuar na adaptação metabólica no tecido adiposo ao "efeito sanfona", resultando em ganho de peso.[117]

Em humanos, os estudos sobre efeitos das dietas de restrição energética e "efeito sanfona" vêm aumentando e alertando sobre as consequências à saúde e ao ganho de peso.[118-120] Tem-se demonstrado, por exemplo, que os ciclos de perda e ganho de peso são associados ao maior risco cardiovascular em longo prazo em função do estresse do sistema cardiovascular.[121] Estudo com camundongos machos demonstrou estado pró-inflamatório exacerbado no tecido adiposo após ciclos de perda e ganho de peso.[116] Em homens, estudo recente observou mudanças na sensibilidade e na secreção de insulina após ciclos de perda e ganho de peso, associadas a alterações em hormônios como grelina, leptina, adiponectina e da tireoide.[122]

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A epidemia mundial de obesidade decorre de alterações relacionadas ao estilo de vida, ao meio ambiente e às características genéticas, bem como de interações entre esses fatores. Nos últimos anos, as pesquisas a respeito da genética da obesidade comum não sindrômica têm contribuído para esclarecer mecanismos relacionados a essa condição. Os GWAS, em particular, têm sido muito úteis na identificação de diversos genes e variações genéticas fortemente associados à obesidade comum ou ao IMC, com particular destaque para a importante relação de grande parte desses genes com o eixo gastroneuroendócrino, principalmente com o centro de regulação da fome e da saciedade.

Entretanto, quando os efeitos de diversos genes relacionados à obesidade são avaliados de maneira individual, a explicação da alta herdabilidade observada torna-se prejudicada, o que sugere efeitos sinérgicos entre vários genes e, ainda, a importância da interação com aspectos relativos ao meio ambiente.

Nesse sentido, esforços de consórcios internacionais visam descrever variações genéticas que contribuem para o desenvolvimento da obesidade e caracterizar interações entre genes e nutrientes, com vistas à implementação de orientações nutricionais personalizadas para a redução do risco de desenvolvimento e para o tratamento da obesidade. Os benefícios potenciais das informações em genômica nutricional acerca de aspectos relacionados à

obesidade incluem a identificação de subgrupos que podem ser particularmente sensíveis ou resistentes a intervenções alimentares, de estilo de vida ou farmacológicas, bem como a melhora da compreensão dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da obesidade. Entretanto, aspectos potencialmente negativos também podem estar presentes, como o fato de a informação genética poder simplificar demais o entendimento da doença, por não focar em fatores ambientais e, assim, resultar em fatalismo e disparidades de saúde.[123] Dessa forma, mais estudos de genômica nutricional são necessários para apoiar a prescrição clínica das intervenções personalizadas para o tratamento da obesidade.[124]

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. [WHO] World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation. WHO Technical Report Series 894. 2000: 252p.
2. Canella DS, Levy RB, Martins AP, Claro RM, Moubarac JC, Baraldi LG, Cannon G, Monteiro CA. Ultra-processed food products and obesity in Brazilian households (2008-2009). PLoS One. 2014;9(3):e92752.
3. [WHO] World Health Organization. Obesity and overweight. Fact sheet. 2014 (updated jun. 2016).
4. Jauch-Chara K, Oltmanns KM. Prog Neurobiol. Obesity: a neuropsychological disease? Systematic review and neuropsychological model. 2014;114:84-101.
5. O'Rahilly S, Farooqi IS. Human obesity: a heritable neurobehavioral disorder that is highly sensitive to environmental conditions. Diabetes. 2008;57:2905-10.
6. Ordovas JM, Corella D. Nutritional genomics. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2004;5:71-118.
7. DeBusk RM, Fogarty CP, Ordovas JM, Kornman KS. Nutritional genomics in practice: where do we begin? J Am Diet Assoc. 2005;105(4):589-98.
8. Doo M, Kim Y. Obesity: interactions of genome and nutrients intake. Prev Nutr Food Sci. 2015;20(1):1-7.
9. Simopoulos AP. Nutrigenetics/Nutrigenomics. Annu Rev Public Health. 2010;31:53-68.
10. Prentice AM. Nutrition and chronic disease: lessons from the developing and developed world. Nestle Nutr Inst Workshop Ser. 2014;78:155-56.
11. Esparza J, Fox C, Harper IT, Bennett PH, Schulz LO, Valencia ME et al. Daily energy expenditure in Mexican and USA Pima indians: low physical activity as a possible cause of obesity. Int J Obes Relat Metab Disord. 2000;24(1):55-59.
12. Palou A, Bonet ML. Challenges in obesity research. Nutr Hosp. 2013;Suppl 5:144-53.
13. Bouchard C. The response to exercise with constant energy intake in identical twins. Obes Res. 1994;2(5):400-10.
14. Day FR, Loos RJ. Developments in obesity genetics in the era of genome-wide association studies. J Nutrigenetics Nutrigenomics. 2011;4:222-38.
15. Keijer J, Hoevenaars FP, Nieuwenhuizen A, van Schothorst EM. Nutrigenomics of body weight regulation: a rationale for careful dissection of individual contributors. Nutrients. 2014;6(10):4531-51.
16. Mulvihill MM, Nomura DK. Metabolomic strategies to map functions of metabolic pathways. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2014;307:E237-E244.
17. Fenech M, El-Sohemy A, Cahill L, Ferguson LR, French TA, Tai ES et al. Nutrigenetics and nutrigenomics: viewpoints on the current status and applications in nutrition research and practice. J Nutrigenet Nutrigenomics. 2011;4:69-89.
18. Rosado EL. Nutrigenômica na gênese da obesidade. In: Mancini MC et al. Tratado de obesidade. São Paulo: AC Farmacêutica; 2010.
19. Herrera BM, Lindgren CM. Lindgren. The genetics of obesity. Curr Diab Rep. 2010;10(6):498-505.
20. Mason K, Page L, Balikcioglu PG. Screening for hormonal, monogenic, and syndromic disorders in obese infants and children. Pediatr Ann. 2014;43(9):e218-24.
21. Domingue BW, Belsky DW, Harris KM, Smolen A, McQueen MB, Boardman JD. Polygenic risk predicts obesity in both white and black young adults. PLoS One. 2014;9(7):e101596.
22. Fall T, Ingelsson E. Genome-wide association studies of obesity and metabolic syndrome. Mol. Cell. Endocrinol. 2014; 382:740-57.
23. Hinney A, Hebebrand J. Polygenic obesity in humans. Obes Facts. 2008;1(1):35-42.
24. Marques-Lopes I, Marti A, Moreno-Aliaga MJ, Martinez A. Aspectos genéticos da obesidade. Rev Nutr. 2004;17(3):327-38.
25. Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B et al. The human obesity gene map: the 2005 update. Obesity. 2006;14:529-644.
26. Wang Y, Wang A, Donovan SM, Teran-Garcia M. Strong Kids Research Team. Individual genetic variations related to satiety and appetite control increase risk of obesity in preschool-age children in the Strong kids program. Hum Hered. 2013;75(2-4):152-59.
27. Walley AJ, Asher JE, Froguel P. The genetic contribution to non-syndromic human obesity. Nat Rev Genet. 2009;10:431-42.
28. Loos RJ, Bouchard C. FTO: the first gene contributing to common forms of human obesity. Obes Rev. 2008;9(3):246-50.
29. Frayling TM et al. Genome-wide association studies provide new insights into type 2 diabetes aetiology. Nat Rev Genet. 2007;8(9):657-62.
30. Hinney A, Nguyen TT, Scherag A, Friedel S, Brönner G, Müller TD et al. Genome wide association (GWA) study for early onset extreme obesity supports the role of fat mass and obesity associated gene (FTO) variants. PLoS One. 2007;2(12):e1361.
31. Scuteri A, Sanna S, Chen W-M, Uda M, Albai G, Strait J et al. Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. PLoS Genet. 2007;3:e115
32. Li H, Wu Y, Loos RJF, Hu FB, Liu Y, Wang J et al. Variants in FTO gene are not associated with obesity in a Chinese Han population. Diabetes. 2008;57:264-68.
33. Horikoshi M, Hara K, Ito C, Shojima N, Nagai R, Ueki K et al. Variations in the HHEX gene are associated with increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. Diabetologia. 2007;50:2461-66.
34. Ohashi J, Naka I, Kimura R, Natsuhara K, Yamauchi T, Furusawa T et al. FTO polymorphisms in oceanic populations. J Hum Genet. 2007;52:1031-35.
35. Karra E et al. A link between FTO, ghrelin, and impaired brain food-cue responsivity. J Clin Invest. 2013;123(8):3539-51.
36. Wardle J, Carnell S, Haworth CM, Farooqi IS, O'Rahilly S, Plomin R. Obesity associated genetic variation in FTO is as-

sociated with diminished satiety. J Clin Endocrinol Metab. 2008;93(9):3640-43.
37. Wardle J, Llewellyn C, Sanderson S, Plomin R. The FTO gene and measured food intake in children. Int J Obes. 2009;33(1):42-45.
38. Cecil J, Tavendale R, Watt P, Hetherington M, Palmer C. An obesity-associated FTO gene variant and increased energy intake in children. N Engl J Med. 2008;359(24):2558-66.
39. Da Silva CF, Zandoná MR, Vitolo MR, Campagnolo PD, Rotta LN, Almeida S, Mattevi VS. Association between a frequent variant of the FTO gene and anthropometric phenotypes in Brazilian children. BMC Med Genet. 2013;14:34.
40. Kilpeläinen T et al. Physical activity attenuates the influence of FTO variants on obesity risk: a meta-analysis of 218,166 adults and 19,268 children. PLoS Med. 2011;8(11):e1001116.
41. Corella D, Arnett DK, Tucker KL, Kabagambe EK, Tsai M, Parnell LD et al. A high intake of saturated fatty acids strengthens the association between the fat mass and obesity-associated gene and BMI. J Nutr. 2011;141(12):2219-25.
42. Hinney A, Vogel CI, Hebebrand J. From monogenic to polygenic obesity: recent advances. Eur Child Adolesc Psychiatry. 2010;19(3):297-310.
43. Loos RJ et al. Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity. Nat Genet. 2008;40:768-75.
44. Xi B, Chandak GR, Shen Y, Wang Q, Zhou D. Association between common polymorphism near the MC4R gene and obesity risk: a systematic review and meta-analysis. PLoS One. 2012;7(9):e45731.
45. Wang D, Ma J, Zhang S, Hinney A, Hebebrand J, Wang Y, Wang HJ. Association of the MC4R V103I polymorphism with obesity: a Chinese case-control study and meta-analysis in 55,195 individuals. Obesity (Silver Spring). 2010;18(3):573-9.
46. Meyre D, Delplanque J, Chèvre JC, Lecoeur C, Lobbens S, Gallina S et al. Genome-wide association study for early-onset and morbid adult obesity identifies three new risk loci in European populations. Nature Genetics. 2009;41:157-59.
47. Geller F, Reichwald K, Dempfle A, Illig T, Vollmert C, Herpertz S et al. Melanocortin-4 receptor gene variant i103 is negatively associated with obesity. Am J Hum Genet. 2004;74(3):572-81.
48. Razquin C, Marti A, Martinez JA. Evidences on three relevant obesogenes: MC4R, FTO and PPAR-gama. Approaches for personalized nutrition. Mol Nutr Food Res. 2011;55:136-49.
49. Holzapfel C, Grallert H, Huth C, Wahl S, Fischer B et al. Genes and lifestyle factors in obesity: results from 12,462 subjects from Monica/Kora. Int J Obes. 2010;34:1538-45.
50. Lafontan M, Berlan M. Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. J Lipid Res. 1993;34(7):1057-91.
51. Lima JJ, Feng H, Duckworth L, Wang J, Sylvester JE, Kissoon N, Garg H. Association analyses of adrenergic receptor polymorphisms with obesity and metabolic alterations. Metabolism. 2007;56(6):757-65.
52. Gjesing AP, Andersen G, Burgdorf KS, Borch-Johnsen K, Jørgensen T, Hansen T, Pedersen O. Studies of the associations between functional beta2-adrenergic receptor variants and obesity, hypertension and type 2 diabetes in 7,808 white subjects. Diabetologia. 2007 Mar;50(3):563-8.
53. Zhang H, Wu J, Yu L. Association of Gln27Glu and Arg16Gly polymorphisms in Beta2-adrenergic receptor gene with obesity susceptibility: a meta-analysis. PLoS One. 2014;9(6):e100489.
54. Reihsaus E, Innis M, MacIntyre N, Liggett SB. Mutations in the gene encoding for the beta 2-adrenergic receptor in normal and asthmatic subjects. Am J Respir Cell Mol Biol. 1993;8:334-39.
55. Chou YC, Tsai CN, Lee YS, Pei JS. Association of adrenergic receptor gene polymorphisms with adolescent obesity in Taiwan. Pediatr Int. 2012;54(1):111-6.
56. Large V, Hellström L, Reynisdottir S, Lönnqvist F, Eriksson P, Lannfelt L et al. Human beta-2 adrenoceptor gene polymorphisms are highly frequent in obesity and associate with altered adipocyte beta-2 adrenoceptor function. J Clin Invest. 1997;100(12):3005-13.
57. Martínez JA, Corbalán MS, Sánchez-Villegas A, Forga L, Marti A, Martínez-González MA. Obesity risk is associated with carbohydrate intake in women carrying the Gln27Glu beta2-adrenoceptor polymorphism. J Nutr. 2003;133(8):2549-54.
58. Ruiz JR, Larrarte E, Margareto J, Ares R, Labayen I. Role of β2-adrenergic receptor polymorphisms on body weight and body composition response to energy restriction in obese women: preliminary results. Obesity. 2011;19(1):212-15.
59. Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G, Lawrence E, Cheetham CH, Prentice AM, Hughes IA, McCamish MA, O'Rahilly S. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. N Engl J Med. 1999;341(12):879-84.
60. Schwartz MW, Baskin DG, Bukowski TR, Kuijper JL, Foster D, Lasser G, Prunkard DE, Porte D Jr, Woods SC, Seeley RJ, Weigle DS. Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. Diabetes. 1996;45(4):531-5.
61. Münzberg H, Morrison CD. Structure, production and signaling of leptin. Metabolism. 2015;64(1):13-23.
62. Pereira-Lancha LO, Campos-Ferraz PL, Lancha AH Jr. Obesity: considerations about etiology, metabolism, and the use of experimental models. Diabetes Metab Syndr Obes. 2012;5:75-87.
63. Yan J, Wang X, Tao H, Yang W, Luo M, Lin F. Lack of association between leptin G-2548A polymorphisms and obesity risk: Evidence based on a meta-analysis. Obes Res Clin Pract. 2015;9(4):389-97.
64. Oliveira RD, Cerda A, Genvigir FD, Sampaio MF, Armaganijan D, Bernik MM, Dorea EL, Hirata MH, Hinuy HM, Hirata RD. Leptin receptor gene polymorphisms are associated with adiposity and metabolic alterations in Brazilian individuals. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2013;57(9):677-84.
65. Le Stunff C, Le Bihan C, Schork NJ, Bougnères P. A common promoter variant of the leptin gene is associated with changes in the relationship between serum leptin and fat mass in obese girls. Diabetes. 2000;49(12):2196-200.
66. Ren W, Zhang SH, Wu J, Ni YX. Polymorphism of the leptin gene promoter in pedigrees of type 2 diabetes mellitus in Chongqing, China. Chin Med J (Engl). 2004;117(4):558-61.
67. Yiannakouris N, Melistas L, Yannakoulia M, Mungal K, Mantzoros CS. The-2548G/A polymorphism in the human leptin gene promoter region is associated with plasma free leptin levels; interaction with adiposity and gender in healthy subjects. Hormones (Athens). 2003;2(4):229-36.
68. Huuskonen A, Lappalainen J, Tanskanen M, Oksala N, Kyröläinen H, Atalay M. Genetic variations of leptin and leptin receptor are associated with body composition changes in response to physical training. Cell Biochem Funct. 2010;28(4):306-12.
69. Hinuy HM, Hirata MH, Forti N, Diament J, Sampaio MF, Armaganijan D, Salazar LA, Hirata RD. Leptin G-2548A promoter polymorphism is associated with increased plasma leptin and BMI in Brazilian women. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2008;52(4):611-6.

70. Crescenti A, Solà R, Valls RM, Anguera A, Arola L. Polymorphisms in LEP and NPY genes modify the response to soluble fibre Plantago ovata husk intake on cardiovascular risk biomarkers. Genes Nutr. 2013;8(1):127-36.
71. Haworth CM, Butcher LM, Docherty SJ, Wardle J, Plomin R. No evidence for association between BMI and 10 candidate genes at ages 4, 7 and 10 in a large UK sample of twins. BMC Med Genet. 2008;9:12.
72. Deram S, Nicolau CY, Perez-Martinez P, Guazzelli I, Halpern A, Wajchenberg BL et al. Effects of perilipin (PLIN) gene variation on metabolic syndrome risk and weight loss in obese children and adolescents. J Clin Endocrinol Metab. 2008;93(12):4933-40.
73. Rosenquist JN, Lehrer SF, O'Malley AJ, Zaslavsky AM, Smoller JW, Christakis NA. Cohort of birth modifies the association between FTO genotype and BMI. Proc Natl Acad Sci USA. 2014;pii:201411893.
74. Norheim F, Gjelstad IM, Hjorth M et al. Molecular nutrition research: the modern way of performing nutritional science. Nutrients. 2012;4:1898-944.
75. Kang JX. Identification of metabolic biomarkers for personalized nutrition. J Nutrigenet Nutrigenomics. 2012;5(2):I–II.
76. Kang JX. The coming of age of nutrigenetics and nutrigenomics. J Nutrigenet Nutrigenomics. 2012;5(1):I–II.
77. Moonesinghe R, Liu T, Khoury MJ. Evaluation of the discriminative accuracy of genomic profiling in the prediction of common complex diseases. Eur J Hum Genet. 2010;18:485-89.
78. San Cristobal R, Milagro FI, Martínez JA. Future challenges and present ethical considerations in the use of personalized nutrition based on genetic advice. J Acad Nutr Diet. 2013;113:1447-54.
79. Belsky DW, Moffitt TE, Sugden K, Williams B, Houts R, McCarthy J, Caspi A. Development and evaluation of a genetic risk score for obesity. Biodemography Soc Biol. 2013;59(1):85-100.
80. Zhu J, Loos RJ, Lu L, Zong G, Gan W, Ye X et al. Associations of genetic risk score with obesity and related traits and the modifying effect of physical activity in a Chinese Han population. PLoS One. 2014;9(3):e91442.
81. Casas-Agustench P, Arnett DK, Smith CE, Lai CQ, Parnell LD, Borecki IB et al. Saturated fat intake modulates the association between an obesity genetic risk score and body mass index in two US populations. J Acad Nutr Diet. 2014;114(12):1954-66.
82. Goni L, Cuervo M, Milagro FI, Martínez JA. A genetic risk tool for obesity predisposition assessment and personalized nutrition implementation based on macronutrient intake. Genes Nutr. 2015;10(1):445.
83. Ordovás Muñoz JM. Predictors of obesity: the "power" of the omics. Nutr Hosp. 2013;Suppl 5:63-71.
84. Kaput J. Nutrigenomics research for personalized nutrition and medicine. Curr Opin Biotechnol. 2008;19(2):110-20.
85. Ordovas J. Diet/genetic interactions and their effects on inflammatory markers. Nutr Rev. 2007;65(12 Pt 2):S203-7.
86. Colley DL, Castonguay TW. Effects of sugar solutions on hypothalamic appetite regulation. Physiol Behav. 2015;139:202-09.
87. DiNicolantonio JJ, O'Keefe JH, Lucan SC. Added fructose: a principal driver of type 2 diabetes mellitus and its consequences. Mayo Clin Proc. 2015;S0025-6196(15)00040-3.
88. Gómez-Santos C, Gómez-Abellán P, Madrid JA et al. Circadian rhythm of clock genes in human adipose explants. Obesity 2009;17:1481-85.
89. Garaulet M, Ordovas JM, Madrid JA. The chronobiology, etiology and pathophysiology of obesity. Int J Obes. 2010; 34(12):1667-83.
90. Barnes S. Nutritional genomics, polyphenols, diets, and their impact on dietetics. J Am Diet Assoc. 2008;108(11):1888-95.
91. Drummond EM, Gibney ER. Epigenetic regulation in obesity. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2013;16(4):392-97.
92. Parsons TJ, Power C, Manor O. Fetal and early life growth and body mass index from birth to early adulthood in 1958 British cohort: longitudinal study. BMJ. 2001;323(7325):1331-35.
93. Godfrey KM, Sheppard A, Gluckman PD et al. Epigenetic gene promoter methylation at birth is associated with child's later adiposity. Diabetes. 2011;60:1528-34.
94. Choi SW, Friso S. Epigenetics: a new bridge between nutrition and health. Adv Nutr. 2010;1(1):8-16.
95. Kaminen-Ahola N, Ahola A, Maga M, Mallitt KA, Fahey P, Cox TC et al. Maternal ethanol consumption alters the epigenotype and the phenotype of offspring in a mouse model. PLoS Genet. 2010;6(1):e1000811.
96. Masuyama H, Hiramatsu Y. Effects of a high-fat diet exposure in utero on the metabolic syndrome-like phenomenon in mouse offspring through epigenetic changes in adipocytokine gene expression. Endocrinology. 2012;153:2823-30.
97. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature. 2006;444:1027-31.
98. Tilg H, Kaser A. Gut microbiome, obesity, and metabolic dysfunction. J Clin Invest. 2011;121:2126-32.
99. Caricilli AM, Saad MJ. Gut microbiota composition and its effects on obesity and insulin resistance. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2014;17(4):312-18.
100. Coll AP, Farooqi IS, O'Rahilly S. The hormonal of food intake. Cell. 2007;129:251-62.
101. Marti A, Goyenechea E, Martínez JA. Nutrigenetics: a tool to provide personalized nutritional therapy to the obese. J Nutrigenet Nutrigenomics. 2010;3:157-69.
102. Abete I, Navas-Carretero S, Marti A, Martinez JA. Nutrigenetics and nutrigenomics of caloric restriction. Prog Mol Biol Transl Sci. 2012;108:323-46.
103. Huang T, Qi Q, Li Y, Hu FB, Bray GA, Sacks FM et al. FTO genotype, dietary protein, and change in appetite: the Preventing Over-weight Using Novel Dietary Strategies trial. Am J Clin Nutr. 2014;99(5):1126-30.
104. Locke AE et al. Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. Nature. 2015;518(7538):197-206.
105. Anderson RM, Shanmuganayagam D, Weindruch R. Caloric restriction and aging: studies in mice and monkeys. Toxicol Pathol. 2009;37:47-51.
106. Carr KD. Augmentation of drug reward by chronic food restriction: behavioral evidence and underlying mechanisms. Physiol. Behav. 2002;76:353-64.
107. Frank GK, Reynolds JR, Shott ME, Jappe L, Yang TT, Tregellas JR et al. Anorexia nervosa and obesity are associated with opposite brain reward response. Neuropsychopharmacology. 2012;37:2031-46.
108. Holsen LM, Lawson EA, Blum J, Ko E, Makris N, Fazeli PK et al. Food motivation circuitry hypoactivation related to hedonic and nonhedonic aspects of hunger and satiety in women with active anorexia nervosa and weight-restored women with anorexia nervosa. J. Psychiatry Neurosci. 2012;37:322-32.
109. Siep N, Roefs A, Roebroeck A, Havermans R, Bonte ML, Jansen A. Hunger is the best spice: an fMRI study of the effects of attention, hunger and calorie content on food reward processing in the amygdala and orbitofrontal cortex. Behav Brain Res. 2009;198:149-58.

110. Goldstone AP, Prechtl de Hernandez CG, Beaver JD, Muhammed K, Croese C, Bell G et al. Fasting biases brain reward systems towards highcalorie foods. Eur. J. Neurosci. 2009;30:1625-35.
111. Leibel RL, Rosenbaum M, Hirsch J. Changes in energy expenditure resulting from altered body weight. N Engl J Med. 1995;332(10):621-28.
112. Considine RV et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. N Engl J Med. 1996; 334(5):292-95.
113. Keim NL, Stern JS, Havel PJ. Relation between circulating leptin concentrations and appetite during a prolonged, moderate energy deficit in women. Am J Clin Nutr. 1998;68(4):794-801.
114. Sumithran P, Prendergast LA, Delbridge E, Purcell K, Shulkes A, Kriketos A et al. Long-term persistence of hormonal adaptations to weight loss. N Engl J Med. 2011;365(17):1597-604.
115. Pankevich DE, Teegarden SL, Hedin AD, Jensen CL, Bale TL. Caloric restriction experience reprograms stress and orexigenic pathways and promotes binge eating. J Neurosci. 2010;30(48): 16399-407.
116. Barbosa-da-Silva S, Fraulob-Aquino JC, Lopes JR, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Weight cycling enhances adipose tissue inflammatory responses in male mice. PLoS One. 2012;7(7):e39837.
117. Dankel SN et al. Weight cycling promotes fat gain and altered clock gene expression in adipose tissue in C57BL/6J mice. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2014;306(2):E210-24.
118. Dulloo AG, Jacquet J, Montani JP, Schutz Y. How dieting makes the lean fatter: from a perspective of body composition autoregulation through adipostats and proteinstats awaiting discovery. Obes Rev. 2015;Suppl 1:25-35.
119. Dulloo AG, Jacquet J, Montani JP. How dieting makes some fatter: from a perspective of human body composition autoregulation. Proc Nutr Soc. 2012;71(3):379-89.
120. Pietiläinen KH, Saarni SE, Kaprio J, Rissanen A. Does dieting make you fat? A twin study. Int J Obes. 2012;36(3):456-64.
121. Montani JP, Viecelli AK, Prévot A, Dulloo AG. Weight cycling during growth and beyond as a risk factor for later cardiovascular diseases: the ‘repeated overshoot’ theory. Int J Obes. 2006;Suppl 4:S58-66.
122. Karschin J, Lagerpusch M, Enderle J, Eggeling B, Müller MJ, Bosy-Westphal A. Endocrine determinants of changes in insulin sensitivity and insulin secretion during a weight cycle in healthy men. PLoS One. 2015;10(2):e0117865.
123. Bloss CS, Wineinger NE, Darst BF, Schork NJ, Topol EJ. Impact of direct-to-consumer genomic testing at long term follow-up. J Med Genet. 2013;50(6):393-400.
124. De Caterina R. Opportunities and challenges in nutrigenetics/nutrigenomics and health. J Nutrigenet Nutrigenomics. 2010;3(4-6):137-43.

21 Vitamina D e doenças crônicas não transmissíveis

Barbara Santarosa Emo Peters
Kelly Virecoulon Giudici
Lígia Araújo Martini

INTRODUÇÃO

A vitamina D [25(OH)D] é um seco-esteroide produzido de forma endógena na pele ou obtido por meio da ingestão de alimentos fontes. Para se tornar ativa, deve passar por duas hidroxilações sucessivas: primeiro no fígado, formando a 25-hidroxivitamina D [25(OH) D3]; depois nos rins, formando seus dois principais metabólitos: 1-alfa,25-di-hidroxivitamina D [1,25$(OH)_2$D] e 24R,25-di-hidroxivitamina D3 [24R,25$(OH)_2$D]. Contudo, foram isolados e quimicamente caracterizados 37 diferentes metabólitos da vitamina D3, cujas funções ainda não estão bem esclarecidas.[1]

O ponto mais importante na regulação do sistema endócrino da vitamina D ocorre nos rins, por meio do controle rigoroso da atividade da enzima 1 alfa-hidroxilase. A produção do metabólito ativo, 1,25$(OH)_2$D, também chamado de calcitriol, pode ser modulada de acordo com a concentração plasmática de 1,25$(OH)_2$D, do paratormônio (PTH) e das concentrações séricas de cálcio e fosfato. Também dependerá de outras necessidades endócrinas do organismo, como as que ocorrem durante a gestação, a lactação e o crescimento.[2]

A 1,25$(OH)_2$D é um hormônio fundamental para a homeostase do cálcio e o desenvolvimento de um esqueleto saudável. Quando as concentrações séricas de cálcio diminuem, o PTH estimula a atividade da enzima 1 alfa-hidroxilase nos rins. Como resultado, a síntese de 1,25$(OH)_2$D é aumentada, favorecendo a absorção intestinal de cálcio. Além disso, a 1,25$(OH)_2$D estimula a retenção renal de cálcio e, sinergicamente com o PTH, aumenta a reabsorção óssea, liberando mais íons cálcio para a corrente sanguínea. Em nível molecular, a 1,25$(OH)_2$D modula a expressão de genes nos osteoblastos e interfere na síntese da matriz proteica, o que regula a mineralização óssea e denota a essencialidade da vitamina D para o crescimento ósseo.[3] Entretanto, a 1,25$(OH)_2$D pode também estimular diretamente a ativação dos osteoclastos pela indução da expressão do ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (NF-kB) (RANKL, *receptor activator of nuclear factor kappa-b ligand*), promovendo a reabsorção óssea, fundamental para a remodelação dos ossos e o crescimento esquelético. Dessa forma, a 1,25$(OH)_2$D pode manter a homeostase do cálcio mesmo quando o organismo apresentar deficiência desse mineral.[4]

FUNÇÕES FISIOLÓGICAS E RELAÇÃO DA VITAMINA D COM DOENÇAS

Além de ser fundamental ao metabolismo ósseo, a vitamina D realiza outras funções biológicas, especialmente por meio da regulação da transcrição de diversos genes.[5] Na corrente sanguínea, ela é transportada para a célula-alvo ligada à sua proteína carreadora (DBP, *vitamin D binding protein* ou proteína ligadora de vitamina D). No núcleo das células, a 1,25$(OH)_2$D liga-se à porção hidrofóbica do receptor nuclear de vitamina D (VDR, *vitamin D receptor*), formando um complexo hormônio-receptor, o qual forma um heterodímero com o receptor X de retinoides (RXR). Esse complexo se acopla a sequências específicas de nucleotídeos no DNA, conhecidas como elementos de resposta à vitamina D (VDRE, *vitamin D response element*). Esse processo está associado com o recrutamento de proteínas nucleares que funcionam como coativadoras. Uma vez ativado o VDRE, vários fatores de transcrição se ligam a esse complexo, resultando tanto em regulação positiva quanto negativa da expressão gênica.[5,6] Estima-se que a ativação do VDRE possa regular direta ou indiretamente a expressão de 200

a 2.000 genes.[7] A biossíntese e a ação da $1,25(OH)_2D$ estão resumidas na Figura 21.1.

Em humanos, o gene que codifica o VDR está localizado na região cromossômica 12q13.11[8] e estudos relatam que variações genéticas no *VDR* estão associadas com aumento da suscetibilidade e da progressão de diversas doenças.[9, 10] Além disso, estudos de associação ampla do genoma (GWAS, *genome-wide association studies*) adicionaram novas informações com relação às ações endócrina, parácrina e autócrina da vitamina D, uma vez que identificaram polimorfismos em genes que codificam a DBP, a 7-de-hidrocolesterol redutase e outras enzimas conversoras que também atuam nesse contexto.[11, 12]

Estudos recentes evidenciam que a deficiência de vitamina D (concentração sérica de 25(OH)D <20 ng/mL) é um fator etiológico importante na patogênese de condições clínicas e doenças crônicas como obesidade, diabete melito tipo 2 (DM2), doenças cardiovasculares (DCV), osteoporose, doenças autoimunes (p. ex., esclerose múltipla, diabete melito tipo 1 – DM1) e alguns tipos de câncer (cólon, mama, linfoma não Hodgkin).[13] Sendo assim, a expressão ampla do VDR em diferentes tecidos corporais e as múltiplas ações biológicas atribuídas à $1,25(OH)_2D_3$ podem explicar o envolvimento dessa vitamina com diversas doenças.[14]

Estudos recentes também têm discutido o impacto do metabolismo da vitamina D na modulação de eventos epigenéticos, o que pode ocorrer em diferentes níveis. Primeiro, genes envolvidos no sistema de sinalização da vitamina D, como aqueles que codificam o VDR e as enzimas 25-hidroxilase (CYP2R1), 1 alfa-hidroxilase (CYP27B1) e 24-hidroxilase (CYP24A1), apresentam amplas ilhas CpG nas suas regiões promotoras e, portanto, podem ser silenciados por meio de metilação do DNA. Em segundo lugar, o VDR pode interagir fisicamente com proteínas coativadoras e correpressoras, as quais, por sua vez, estão em contato com os modificadores da cromatina, como histonas acetiltransferases (HAT), histonas desacetilases (HDAC), histonas metiltransferases (HMT), histonas desmetilases (HDM) específicas de proteínas com o domínio Jumonji C (JmjC) e famílias de desmetilases lisina-específicas (LSD). Ademais, há evidências de que alguns ligantes do VDR apresentam efeitos desmetilantes do DNA, os quais podem contribuir para o desenvolvimento e a progressão de doenças.[15]

Os tópicos a seguir objetivam elucidar as relações entre a vitamina D e algumas condições clínicas e doenças crônicas, buscando explanar mecanismos de ação, efeitos preventivos e tratamento.

Obesidade

A obesidade provoca alterações metabólicas, como resistência periférica à ação da insulina e disfunção endo-

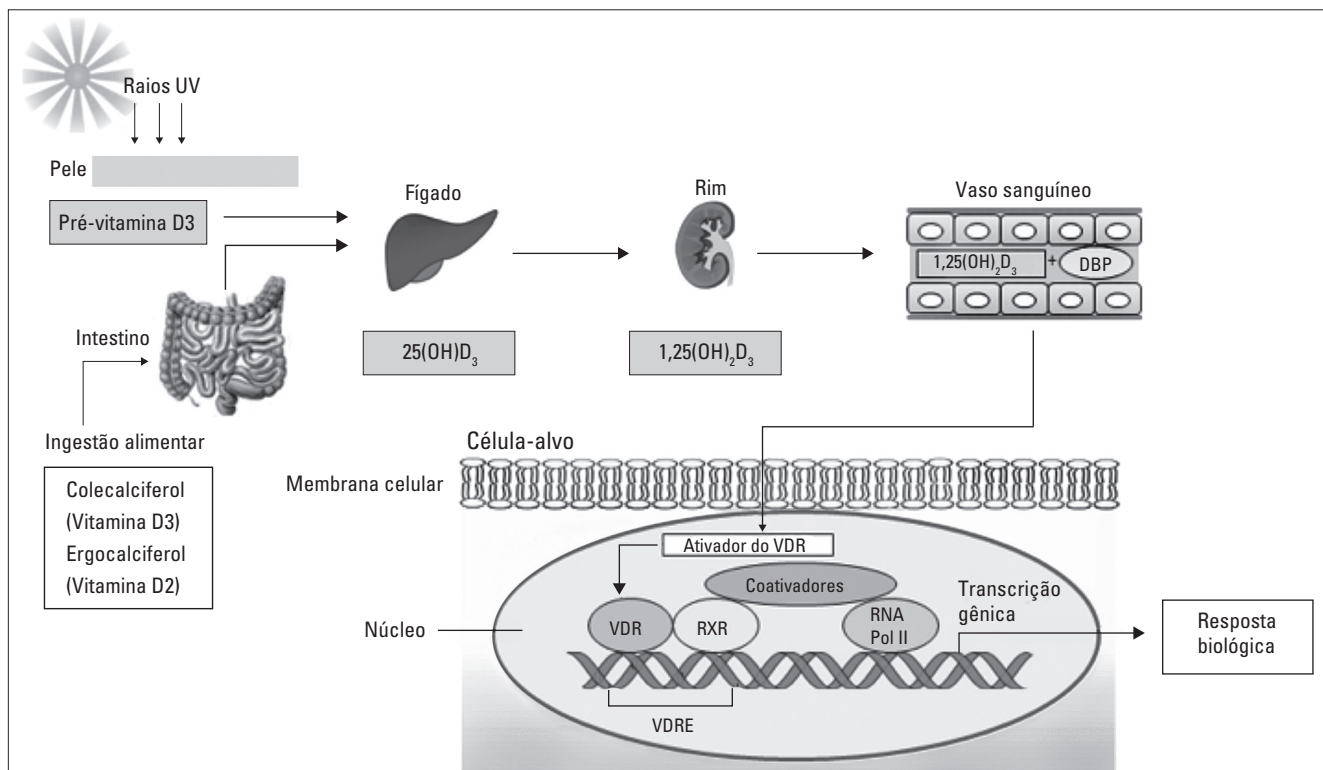



Figura 21.1 Biossíntese e ação da vitamina D. 1,25(OH2)D3: 1,25-di-hidroxi vitamina D3; 25(OH)D3: 25-hidroxi vitamina D; DBP: proteína ligadora de vitamina D; RNA Pol II: RNA polimerase 2; RXR: receptor X de retinoides; UV: ultravioleta; VDR: receptor de vitamina D; VDRE: elemento de resposta à vitamina D. **Fonte:** adaptada de Lamprecht e Lipkin.[6]

telial, as quais implicam aumento do risco cardiovascular. Sua prevalência expressiva e crescente está associada a graves complicações relacionadas não somente com a saúde e o bem-estar dos indivíduos, mas também com os gastos aos cofres públicos. Entre os fatores genéticos subjacentes ao risco hereditário da obesidade, alguns envolvem vias associadas ao metabolismo da vitamina D.[16]

Há evidências de que polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) no gene do VDR, principalmente aqueles localizados no íntron 8 (BsmI – rs1544410, ApaI – rs7975232, Tru9I – rs757343), no *start* códon do éxon 2 (FokI – rs2228570) e no éxon 9 (TaqI – rs731236) (Figura 21.2), estejam relacionados a mecanismos patogenéticos da obesidade. Um estudo de Vasilopoulos et al.[16] com 184 indivíduos gregos adultos e idosos de ambos os sexos demonstrou que a presença de cada alelo de risco em relação ao polimorfismo TaqI (rs731236) contribuiu para um aumento de 3 kg/m^2 no índice de massa corporal (IMC). Em outro estudo, a presença dos genótipos de risco em homozigose relativos aos SNP TaqI e BsmI foram independentemente associados a maior IMC e a maior risco de desenvolvimento de obesidade quando comparada aos genótipos selvagens. A diferença encontrada foi de 9 kg no peso corporal, ou de 4 kg/m^2 no IMC, e foi verificado aumento de 30% na prevalência de obesidade em um grupo de indivíduos franceses caucasianos adultos e idosos de ambos os sexos. Esse mesmo estudo encontrou, ainda, associação positiva do genótipo homozigoto variante do polimorfismo ApaI com a obesidade.[17]

Blumberg et al.[18] definiram o mecanismo molecular pelo qual a vitamina D, via VDR, pode atuar na inibição da adipogênese. Constatou-se, em cultura de adipócitos 3T3-L1, que o bloqueio da adipogênese ocorre por meio da inibição da expressão do RNA mensageiro (RNAm) do fator de transcrição C/EBP beta (do termo *CCAAT-enhancer-binding protein* ou proteína beta intensificadora de ligação a CCAAT) e pelo consequente menor conteúdo nuclear dessa proteína durante o processo de diferenciação. Ademais, o calcitriol permite a regulação positiva do *eight-twenty-one* (ETO), correpressor do C/EBP beta, o que inibiria ainda mais a ação de qualquer C/EBP beta restante no processo de adipogênese. Contudo, na ausência de calcitriol, o VDR inativo parece favorecer o acúmulo de lipídios, por meio de um mecanismo ainda não esclarecido, mas que possivelmente envolve um cofator específico para os adipócitos.

Outro mecanismo envolvendo o VDR inativo capaz de modular o balanço energético em humanos foi demonstrado por Malloy e Feldman.[19] O VDR inibe diretamente a expressão da proteína desacopladora 1 (UCP1) – fundamental na promoção da oxidação de ácidos graxos no tecido adiposo marrom –, a qual está envolvida com o aumento do gasto energético. Já a deleção do VDR aumenta a expressão de UCP1 e resulta em aumento do tecido adiposo marrom. Ademais, a proteína desacopladora 2 (UCP2), encontrada no tecido adiposo branco, também tem sua expressão inibida pela vitamina D, via ligação com o VDR.[20]

Acredita-se, ainda, que a participação da vitamina D na fisiopatologia da obesidade também esteja relacionada à modulação das vias dos receptores do tipo *Toll* (TLR)2 e TLR4, um grupo de glicoproteínas que funcionam como receptores de superfície transmembrana, atuando como moduladores essenciais na inter-relação entre as vias inflamatória e metabólica. A expressão dos genes *TLR2* e *TLR4* está aumentada no tecido adiposo de pessoas obesas, enquanto no tecido adiposo de pessoas com DM2 apenas a expressão do *TLR2* está aumentada, denotando o importante papel desses receptores na inflamação crônica subclínica associada à obesidade.[21] Entretanto, Sadegui et al.[22] demonstraram que o calcitriol pode suprimir a expressão dos genes *TLR2* e *TLR4*, o que implica a atenuação da resposta inflamatória.

Fatores epigenéticos também devem ser considerados em relação à obesidade, uma vez que a deficiência de vitamina D nos pais é capaz de influenciar desfechos adversos durante a gestação e a suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta e até mesmo na próxima geração.[23]

Desse modo, reconhece-se que a deficiência de vitamina D atua como fator de risco independente para a obesidade e o acúmulo excessivo de gordura corporal,[24] o que pode ser explicado pela interação dessa vitamina com

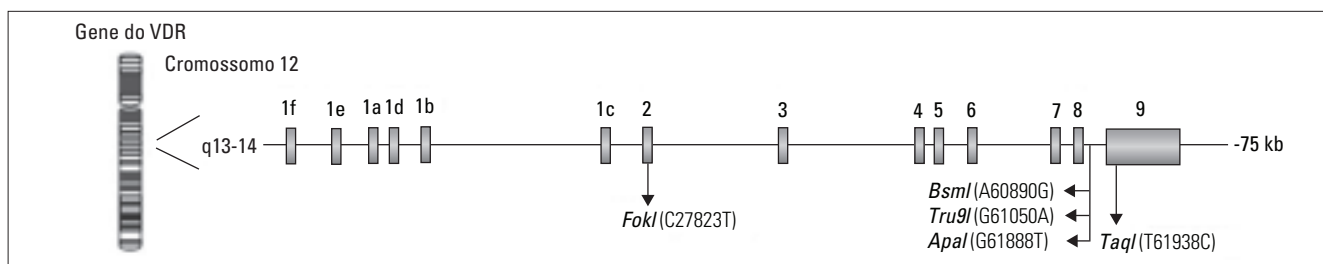



Figura 21.2 Gene do receptor de vitamina D (VDR) localizado no cromossomo 12q e seus principais polimorfismos identificados por enzimas de restrição. **Fonte:** adaptada de Deeb et al.[25]

diferentes vias metabólicas, exploradas com mais detalhes a seguir.

Homeostase da glicose e o DM2

A relação inversa observada entre concentrações séricas da vitamina D, resistência à insulina e intolerância à glicose[26] despertou o interesse para a investigação dos mecanismos de atuação da vitamina D na homeostase da glicose. Demonstrou-se que a atuação endócrina da vitamina D ocorre durante a diferenciação de adipócitos, uma vez que o calcitriol parece estimular a síntese e a secreção da lipase de lipoproteínas (LPL) em cultura de adipócitos,[27] e também na regulação da secreção de insulina e na manutenção da tolerância à glicose.[17] Além disso, observou-se que variações na sequência de nucleotídeos do *VDR* modulam a secreção de insulina em resposta à glicose. Um estudo mostrou que indivíduos carreadores dos genótipos GG (do SNP ApaI), GG (do SNP BsmI) e TT (do SNP TaqI) apresentaram concentrações de insulina 50% inferiores àquelas observadas em indivíduos com genótipos TT, AA ou CC para os respectivos polimorfismos, enquanto indivíduos heterozigotos apresentaram valores intermediários.[28]

O genótipo GG (do SNP ApaI) também foi associado à intolerância à glicose e à glicemia de jejum aumentada em adultos não diabéticos eutróficos e também em obesos,[29] enquanto os genótipos TT (do SNP TaqI) e GG (do SNP BsmI) associaram-se à capacidade reduzida de secreção de insulina.[30] Já o genótipo homozigoto selvagem para o SNP FokI (CC) associou-se com maior sensibilidade à insulina, embora não tenha sido observada influência na função das células beta pancreáticas.[31]

Acredita-se que variações genéticas no *VDR* também possam contribuir para a patogênese do DM2 por meio da modificação da expressão de citocinas (como interleucina [IL]-2, IL-6, IL-12, interferon-gama [IFN-gama], fator de necrose tumoral alfa e fator de necrose tumoral beta)[32] e pela alteração no metabolismo do cálcio. A presença do alelo selvagem GG (SNP BsmI) relacionou-se à redução da absorção de cálcio por transporte ativo (em razão do provável defeito funcional no VDR intestinal) em mulheres pós-menopausa com baixo consumo de cálcio,[33] ao aumento da glicemia de jejum em homens adultos membros de tripulação das Forças Armadas da Alemanha com baixo nível de atividade física[34] e ao DM2 em homens e mulheres alemães adultos e idosos com alto risco para doença arterial coronariana.[35]

Além das variações clássicas na sequência de nucleotídeos do *VDR*, um polimorfismo, o rs11568820 (-1270 G $\rightarrow$ A), presente na região promotora do *VDR*, especificamente no sítio de ligação da Cdx2, uma proteína envolvida na transcrição do *VDR* em nível intestinal, parece favorecer a absorção intestinal de cálcio, uma vez que o alelo A determina maior afinidade pelo fator de transcrição que o alelo G.[36] Estudos que associam esse polimorfismo a parâmetros metabólicos são ainda escassos, porém acredita-se que a Cdx2 seja capaz de influenciar a homeostase da glicose por interferir na absorção de cálcio, uma vez que o fluxo de cálcio e a regulação de seus estoques intracelulares são essenciais no controle da secreção de insulina pelas células beta pancreáticas. Em um estudo com mulheres austríacas entre 16 e 45 anos de idade, com síndrome do ovário policístico, o genótipo AA foi associado a concentrações mais baixas de insulina de jejum, menor resistência à ação da insulina (medida pelo índice HOMA-IR) e maior sensibilidade à insulina avaliada pelos índices Quicki e de Matsuda.[37]

Apesar dessas evidências, a relação entre polimorfismos no gene do VDR e a suscetibilidade ao DM2 ainda não é consistente na literatura. Metanálise realizada com 14 estudos (dos quais nove foram realizados com populações asiáticas) não observou resultados significativos para os polimorfismos ApaI, BsmI e TaqI, porém demonstrou que a presença do alelo variante referente ao SNP FokI foi significativamente associada com o DM2. Indivíduos carreadores desse alelo apresentaram risco para o desenvolvimento de DM2 51% maior quando comparados aos indivíduos com genótipo selvagem.[38] É importante ressaltar que as associações entre polimorfismos do *VDR* e alterações fisiopatológicas podem sofrer influências tanto do nível de exposição solar[39] quanto da ingestão e da biodisponibilidade da vitamina D,[40] fatores que não foram considerados nessa metanálise.

Hipertensão e doenças cardiovasculares

Estudos prospectivos e metanálises têm consistentemente demonstrado associação inversa entre concentrações séricas de 25(OH)D e pressão arterial.[41,42] Os mecanismos que relacionam a deficiência de vitamina D ao aumento da pressão arterial são mediados pela ação do calcitriol na inibição do sistema renina-angiotensina-aldosterona,[43] na alteração da proliferação de células musculares lisas vasculares endoteliais, no aumento da rigidez arterial, na redução da expressão de moléculas de adesão em células endoteliais[44,45] e por sua essencialidade na secreção de insulina.[46] De fato, ativadores do VDR (calcitriol e paricalcitol) podem influenciar a modulação da expressão da renina e a função vascular, reduzindo assim o risco de mortalidade, os danos a órgãos e a morbidade cardiovascular em pacientes hipertensos tratados com tais ativadores.[47]

Em estudos com camundongos *knockout* para o *Vdr* ou para o *Cyp27b1*, além do fenótipo esperado (hipocal-

cemia, hiperparatireoidismo secundário e osteomalácia), foi também observada ocorrência de hipertensão arterial, hipertrofia cardíaca e maior retenção de sódio. Ademais, esses camundongos apresentaram superexpressão de renina, de angiotensina II e de peptídeo natriurético atrial.[48]

A presença de SNP no gene do VDR também está envolvida na regulação da pressão arterial. Muray et al.[49] verificaram que o genótipo Bsml do *VDR* influenciou a pressão arterial de homens normotensos saudáveis. Além disso, o estudo mostrou que o genótipo GG estava associado com pressão arterial sistólica elevada. Entretanto, esses resultados não foram observados em mulheres, talvez pela interferência do estrógeno, que apresenta ação anti-hipertensiva e vasoprotetora.

Um estudo com 535 idosos coreanos teve como objetivo avaliar a influência dos polimorfismos que codificam diferentes enzimas citocromo P450 (CYP) e das concentrações séricas da 25(OH)D sobre a pressão arterial. Além da relação inversa entre 25(OH)D e pressão arterial, os autores verificaram a influência de SNP nas enzimas CYP1A1 (rs4646421) e CYP1B1 (rs2551188, rs1056836) na pressão arterial entre diferentes genótipos. O grupo que apresentava deficiência de vitamina D e alto escore de risco, com base no número de alelos de risco para os três SNP, apresentou maior chance de desenvolver hipertensão arterial. Esse efeito sinérgico das concentrações séricas de 25(OH)D e das variações genéticas nas CYP1A1 e CYP1B1 sobre a pressão arterial foi observado especialmente em indivíduos em tratamento anti-hipertensivo.[50]

Apesar de evidências isoladas, Wang et al.[51] realizaram um GWAS com dados de aproximadamente 100 mil homens e mulheres com descendência europeia participantes do Women's Genome Health Study (WGHS) e do International Consortium of Blood Pressure (ICBP). Nessa avaliação, os pesquisadores não conseguiram replicar as associações observadas previamente entre SNP no *VDR* e a pressão arterial. Entretanto, foram encontradas sugestões de associações negativas entre o polimorfismo rs2853564 do *VDR*; positivas entre os rs6013897 e rs2296241 no gene da CYP24A1 [24-hidroxilase, a principal enzima de degradação da $1,25(OH)_2D_3$]; positivas entre o rs1507023 no gene da RBFOX1 e o rs9937918 no gene da GPR114 [ambos determinantes da circulação da 25(OH)D] com a pressão arterial sistólica, diastólica, pressão arterial média e a pressão de pulso; porém, tais associações perderam significância após correção por testes estatísticos. Também foram detectadas associações significativas, tanto positivas quanto negativas, entre a pressão arterial e polimorfismos em genes que codificam fatores que interagem com o VDR, como o coativador de receptores nucleares 3 (NCoA3), o correpressor de receptor nuclear 2 (NCoR2), o correpressor de receptor nuclear 1 (NcoR1), e também de fatores que interagem com o receptor X de retinoides alfa (RXR-alfa) e com modificadores da síntese da vitamina D, como a 7-de-hidrocolesterol redutase, o supressor de tumor p53 ligado à proteína 1 e a tirosinase relacionada à proteína 1, mas estas também perderam significância após correção com testes estatísticos.[51]

Kunutsor et al.[52] realizaram metanálise de ensaios clínicos randomizados com o objetivo de avaliar o efeito da suplementação de vitamina D tanto na pressão arterial sistólica quanto na pressão arterial diastólica e complementaram os resultados com uma análise de randomização mendeliana para investigar a relação causal entre as concentrações séricas de 25(OH)D e a pressão arterial. Nesse estudo, foram incluídos apenas ensaios clínicos randomizados que tiveram como objetivo estudar os efeitos isolados da suplementação oral de vitamina D, porém, a quantidade e a forma de suplementação foram diferentes entre os estudos. Os autores observaram que a suplementação de vitamina D não promoveu redução significativa das pressões arteriais sistólica e diastólica em indivíduos saudáveis, mas houve maior redução da pressão arterial diastólica em participantes com DCV preexistente. Os autores também identificaram variantes genéticas em quatro *loci* envolvidos na síntese (*DHCR7*, *CYP2R1*) e no metabolismo (*GC*, *CYP24A1*) da 25(OH)D. As variantes em conjunto explicaram apenas 1 a 4% das modificações nas concentrações séricas da 25(OH)D. Entretanto, o rs6013897, localizado na região do gene da CYP24A1, apresentou associação significativa com as pressões arteriais sistólica e diastólica.

Função imune

A vitamina D, por meio de interação com seu receptor, atua também como moduladora da expressão gênica em leucócitos, impactando em suas funções e, consequentemente, modulando as respostas imune e inflamatória.[53] O VDR é expresso em macrófagos e em células dendríticas, os quais são capazes de sintetizar 25(OH)D e $1,25(OH)_2D_3$, por expressarem as enzimas 25-hidroxilase e 1 alfa-hidroxilase, respectivamente. Linfócitos, por sua vez, só expressam a 1 alfa-hidroxilase e, desse modo, essas células são apenas capazes de converter 25(OH)D em $1,25(OH)_2D_3$.[54] Apesar da presença da 1 alfa-hidroxilase em macrófagos e células dendríticas, seu mecanismo de regulação nessas células parece diferir do mecanismo de regulação renal, no qual a 1 alfa-hidroxilase é principalmente regulada pelo PTH, cálcio e $1,25(OH)_2D_3$. Em macrófagos e células dendríticas, a 1 alfa-hidroxilase é predominantemente regulada pelo IFN-gama e pelo lipopolissacarídeo (LPS).[55]

O efeito modulatório da vitamina D nos linfócitos auxiliares $CD4^+$ (*T helper*) influencia o equilíbrio entre as respostas Th1 e Th2, podendo determinar o desfecho de doenças mediadas por fatores imunológicos, como as infecciosas, as autoimunes e as alergias. Tal efeito é explicado pelo processo de diferenciação dos linfócitos auxiliares $CD4^+$ virgens (*naïve*) em Th1 ou Th2. Linfócitos Th1 preferencialmente produzem IL-2 e IFN-gama, promovendo a ativação de macrófagos e respostas imunológicas contra patógenos intracelulares. Por outro lado, linfócitos Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, o que estimula a imunidade humoral por favorecer o crescimento e a diferenciação de linfócitos B, bem como contribui para síntese elevada de imunoglobulinas do tipo E (IgE), degranulação dos mastócitos e ativação de eosinófilos. Linfócitos T expostos à $1,25(OH)_2D_3$ apresentam redução da síntese de IFN-gama e IL-2, enquanto a síntese de IL-4, IL-5 e IL-10 é aumentada, o que direciona a uma resposta Th2.[56] Ademais, a regulação positiva do fator de transcrição GATA3 causada pela $1,25(OH)_2D_3$ também favorece o desenvolvimento da resposta Th2.[57]

É também conhecido o efeito da $1,25(OH)_2D_3$ na redução da resposta inflamatória de macrófagos. Sugere-se que sua ação anti-inflamatória ocorra pelo aumento da expressão do gene do inibidor de kappa B alfa (IkB-alfa) e da estabilidade do seu RNAm e pela redução de sua fosforilação. O IkB-alfa é um inibidor do NF-kB, o qual, por sua vez, regula a transcrição de genes que codificam diversas proteínas envolvidas na resposta inflamatória. O aumento do conteúdo citoplasmático do IkB-alfa favorece a redução da translocação do NF-kB do citosol para o núcleo celular.[58, 59] Mediante a presença de patógenos, entretanto, a vitamina D promove o aumento da imunocompetência, por meio da elevação da capacidade fagocítica e quimiotática de monócitos, bem como do incremento da expressão gênica do VDR e da enzima 1 alfa-hidroxilase, o que induz a expressão do peptídeo antimicrobiano chamado catelicidina. De acordo com esses dados, sugere-se que baixas concentrações séricas de 25(OH)D relacionam-se com aumento da suscetibilidade às infecções microbianas.[60]

A vitamina D influencia, ainda, o risco para o desenvolvimento de doenças autoimunes, como DM1, artrite reumatoide e doença de Crohn. O efeito protetor contra o desenvolvimento de DM1 também está associado à modulação da função imune, uma vez que tal doença caracteriza-se pela infiltração das ilhotas pancreáticas por células mononucleares, em sua maioria linfócitos $CD8^+$ citotóxicos, os quais são regulados por células Th1 dependentes de IL-12. Tal ação leva à destruição das células beta pancreáticas e a um consequente prejuízo na secreção de insulina.[61] O tratamento de camundongos diabéticos não obesos com um análogo da $1,25(OH)_2D_3$ inibiu a produção de IL-12 e a infiltração pancreática de células Th1, ao mesmo tempo em que aumentou a frequência de células T reguladoras $CD4^+CD25^+$ nos gânglios pancreáticos.[62]

Entretanto, nem sempre o tratamento com vitamina D ou seus análogos é capaz de melhorar ou contribuir no tratamento de doenças já estabelecidas, visto que sua atuação pode ser satisfatória somente em momentos importantes do metabolismo celular. Yu e Cantorna[63] demostraram que a exposição a $1,25(OH)_2D_3$ era necessária para que camundongos neonatos apresentassem contagens adequadas de linfócitos T *natural killer* invariantes (iNKT). A deficiência de vitamina D no período intrauterino promoveu alterações epigenéticas que resultaram em redução do número de células iNKT como resultado do aumento da apoptose de precursores de iNKT no timo. Tais alterações não foram revertidas pela administração posterior de $1,25(OH)_2D_3$. Deste modo, observa-se que a disponibilidade de vitamina D durante o desenvolvimento pré-natal é relevante na produção de células iNKT, sendo a redução da contagem dessas células diretamente relacionada ao aumento do risco do desenvolvimento de doenças autoimunes.

Câncer

Assim como está relacionada à função imune, a vitamina D também é capaz de interferir e mediar reações metabólicas relacionadas ao desenvolvimento de células tumorais. No câncer de cólon, um dos tipos mais prevalentes e também mais letais, a vitamina D parece agir estimulando a via de sinalização da e-caderina (proteína envolvida com as propriedades de adesão de células epiteliais e cuja perda relaciona-se a um fenótipo celular invasivo e metastático) e inibindo a sinalização de betacatenina (proteína que, ao sofrer mutação, acumula-se no citosol e então migra para o núcleo celular, contribuindo para a transcrição de genes relacionados a fenótipos oncogênicos). No entanto, o VDR ligado a vitamina D mostrou-se capaz de acelerar a translocação de betacatenina do núcleo celular para o citosol. Outros mecanismos propostos incluem ações adicionais na via de sinalização wnt/betacatenina, que, quando desregulada, associa-se ao surgimento de células tumorais. Assim, observou-se que o tratamento com $1,25(OH_2)D_3$ é capaz de induzir a proteína DICKKOPF-1 (DKK-1, *Dickkopf-related protein 1*), antagonista da wnt, bem como de reduzir a expressão de DKK-4 (d*ickkopf wnt signaling pathway inhibitor 4*), agonista da wnt, em células de câncer de cólon.[64]

Deve-se considerar, porém, que células de câncer de cólon em estágio avançado apresentam redução na

expressão do VDR por mecanismos ainda pouco conhecidos. Especula-se que o fator de transcrição SNAIL1 se ligue ao promotor do gene do VDR, reprimindo sua atividade e, portanto, reduzindo os níveis de expressão de seu RNAm. Outro fator de transcrição, o ZEB1, possui a capacidade de regular negativamente a expressão da e-caderina e aumentar os níveis proteicos do VDR. Tal capacidade é, entretanto, dependente de correpressores (como o CtBP) e coativadores (como o p300).[64]

Células de melanoma e de outros tipos de câncer também expressam o VDR. Algumas linhagens de células em cultura, como SK-Mel5 e IGR, parecem ser resistentes aos efeitos antiproliferativos da $1,25(OH)_2D_3$; todavia, essa sensibilidade pode ser – pelo menos parcialmente – restaurada com tratamentos que regulem os níveis de expressão do RNAm do VDR, por meio do controle da ação de microRNA e de fármacos que apresentam a capacidade de modulação epigenética, como a tricostatina A (TSA) e a 5-azacitidina (5-Aza).[65,66]

Os efeitos benéficos da vitamina D contra o câncer envolvem, em linhas gerais, a regulação da proliferação celular, da apoptose e da angiogênese. Em linhagens de células de tumores de cabeça, pescoço, cólon e próstata, a administração de $1,25(OH)_2D_3$ e análogos induziu a expressão de genes associados com a diferenciação celular, inibindo a proliferação celular tumoral. Além dos efeitos antiproliferativos, a $1,25(OH)_2D_3$ consegue regular mediadores fundamentais da apoptose, reprimindo a expressão de proteínas antiapoptóticas (como BCL2 e BCL-XL) e induzindo a expressão de proteínas pró-apoptóticas (como BAX, BAK e BAD). É capaz, ainda, de inibir a metástase por meio de efeitos antiangiogênicos. Embora muitas dessas reações sejam dependentes da ligação com o VDR, diversos genes que são transcricionalmente influenciados pela $1,25(OH)_2D_3$ não contêm VDRE, o que sugere que sua ativação ou repressão transcricional não seja diretamente mediada pelo VDR.[25]

Em relação aos polimorfismos do *VDR*, uma metanálise recente realizada com 77 estudos independentes associou o SNP FokI com o risco para diversos tipos de câncer (principalmente ovariano e de pele) entre caucasianos, e identificou maior risco para o genótipo TT em relação ao CC. Estima-se que 4.221 casos de câncer de ovário e 52.858 casos de câncer de pele sejam relacionados ao genótipo TT anualmente em âmbito mundial.[9] Em outra metanálise que analisou 126 estudos, observou-se aumento do risco de câncer, sobretudo para os tipos colorretal e de pele, em caucasianos carreadores do alelo G em relação ao polimorfismo BsmI.[67]

Entretanto, os resultados acerca da influência genômica da vitamina D e de polimorfismos do *VDR* sobre o risco para o desenvolvimento de diferentes tipos de câncer são ainda, em sua maioria, controversos e, em alguns casos, até mesmo contraditórios. Tais incompatibilidades podem ser possivelmente explicadas por fatores que interagem com o genótipo e que deveriam ser considerados nas investigações, como a inadequação das concentrações plasmáticas de 25(OH)D. Além disso, devem ser considerados fatores como heterogeneidade racial, tamanho amostral, diferentes estágios de desenvolvimento da doença e tratamentos concomitantes. Ainda assim, importantes resultados corroboram para a influência positiva da vitamina D na redução do risco e no combate a essa doença.

Uma metanálise realizada com estudos caso-controle e estudos de coorte observou que indivíduos com concentrações séricas de 25(OH)D superiores a 33 ng/mL (equivalente a 82 nmol/L) apresentaram incidência de câncer colorretal 50% menor.[68] Outro estudo que avaliou uma coorte de 47.800 homens norte-americanos do *Health Professionals Follow-Up Study* estimou, a partir de um modelo que considerava fatores que impactam as concentrações de 25(OH)D (consumo e suplementação de vitamina D, pigmentação da pele, IMC e exposição solar) em 1.095 indivíduos da amostra, que um aumento de 25 nmol/L nas concentrações séricas de 25(OH)D associou-se a uma redução de 17% na incidência total de câncer e a uma redução de 29% na mortalidade relacionada ao câncer, sendo esses valores ainda superiores quando relacionados somente a tumores no sistema digestório (respectivamente, 43 e 45%).[69] Assim, acredita-se que tratamentos que incluam $1,25(OH)_2D_3$ ou seus análogos como coadjuvantes possam representar uma promissora forma de terapia contra o câncer.

Osteoporose

A vitamina D é relevante para o metabolismo do cálcio e do fósforo e ajuda a manter concentrações adequadas desses minerais no organismo para as funções metabólicas e a mineralização óssea. A $1,25(OH)_2D$ aumenta a eficiência da absorção intestinal de cálcio de 10 a 15% para 30 a 40%, por meio da interação com o heterodímero RXR-VDR. Dessa forma, promove a expressão das proteínas que compõem os canais de cálcio e das ligantes de cálcio (p. ex., calmodulina e calbindina). Estima-se que, em animais, a $1,25(OH)_2D_3$ também aumente a absorção intestinal de fósforo de 50 a 60% para aproximadamente 80%.[70]

A deficiência de vitamina D desempenha papel importante na saúde óssea humana, sendo uma das principais causas de osteoporose, doença com forte componente genético. Deficiência grave de vitamina D [25(OH)D < 10 ng/mL] pode resultar em raquitismo em crianças e em

osteomalácia em adultos.[13] Estudos avaliaram a influência de diferentes polimorfismos do gene do VDR, como o FokI (C>T, rs2228570), BsmI (G>A, rs1544410), ApaI (C>A, rs17879735) e TaqI (T>C, rs731236), sobre a densidade mineral óssea (DMO) e o risco de fraturas. A relação da presença do polimorfismo FokI com desfechos ósseos é bastante conflitante, mas, na maioria das vezes, esse polimorfismo associa-se com maior prevalência e incidência de fraturas e perda da DMO. Em mulheres caucasianas na pós-menopausa, tratadas com bisfosfonatos, o polimorfismo BsmI tem sido associado com menor aumento da DMO. Por outro lado, os polimorfismos TaqI e BsmI relacionam-se com resistência ao tratamento com bisfosfonatos em pacientes caucasianos com doença de Paget.[71,72]

Estudo australiano realizado com gêmeos mono e dizigóticos e na população geral demonstrou que o SNP BsmI (rs 1544410) no VDR foi associado com a DMO. A presença do alelo G em homozigose está relacionada com valores mais elevados de DMO, enquanto o alelo A em homozigose é mais comum em mulheres com valores de DMO abaixo do limiar para risco de fraturas osteoporóticas.[73] Metanálises incorporando resultados apresentados nos principais estudos com VDR também confirmaram a contribuição do SNP BsmI na variação dos valores de DMO.[74-77]

Com o objetivo de avaliar o papel e a relevância de quatro SNP (FokI, BsmI, ApaI e TaqI - rs2228570, rs1544410, rs17879735 e rs731236, respectivamente) do gene do VDR como determinantes genéticos da DMO em mulheres na pós-menopausa do noroeste da Índia, Singh et al.[78] verificaram que a suscetibilidade do haplótipo AGT do gene do VDR influencia a DMO da coluna lombar e do colo do fêmur, conferindo risco considerável para osteopenia e osteoporose.

Contudo, até o momento, os estudos apresentam resultados sugestivos e não conclusivos, pois enquanto alguns mostram associação significativa dos polimorfismos do gene do VDR com a DMO,[75,79,80] outros têm relatado resultados inversos.[81-83] Essas inconsistências em relação ao risco genético envolvido na osteoporose podem ser atribuídas à heterogeneidade genética, à diversidade racial e às interações genes-ambiente e genes-genes ainda não completamente elucidadas.[78]

Fatores epigenéticos também estão envolvidos no desenvolvimento da massa óssea. Estudos em humanos e em animais sugerem que a ingestão de nutrientes durante a gestação pode atuar no desenvolvimento de alterações epigenéticas em genes envolvidos com o metabolismo ósseo ainda em nível intrauterino. A expressão modificada de genes que codificam proteínas formadoras dos canais de cálcio na placenta, por regulação epigenética, é um indicador de que a biodisponibilidade de vitamina D materna pode influenciar a homeostase mineral óssea do neonato.[84,85]

Um estudo longitudinal, que acompanhou 198 crianças britânicas até os 9 anos de idade, mostrou que aproximadamente 31% delas apresentavam insuficiência ou deficiência de vitamina D, assim como 18% de suas mães, no último trimestre de gestação. Quando as crianças foram avaliadas aos 9 anos de idade, houve associação significativa das concentrações de vitamina D com a redução da DMO de corpo total e da coluna lombar.[86]

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A insuficiência de vitamina D, condição encontrada mundialmente em diferentes populações, está relacionada não apenas à regulação e à manutenção do metabolismo ósseo, mas também a condições clínicas e doenças crônicas, incluindo obesidade, diabete, DCV, osteoporose e diversos tipos de câncer. Em parte, isso ocorre porque a forma ativa da vitamina D, o calcitriol, modula direta ou indiretamente cerca de 3% dos genes que compõem o genoma humano, atuando na diferenciação, proliferação, apoptose celular e também na regulação dos sistemas imune, cardiovascular e musculoesquelético e do metabolismo da glicose.

Os efeitos endócrinos da vitamina D são mediados, principalmente, pelo VDR, que é expresso em diversos tipos celulares, demonstrando a atuação da vitamina D para além do intestino, rins e ossos. Evidências recentes demonstram que o VDR está intimamente relacionado ao sistema imune (inato e adaptativo), à secreção de insulina pelas células beta pancreáticas, ao controle da pressão arterial e, ainda, a todo o sistema muscular.

Além disso, GWAS permitiram identificar polimorfismos em diferentes regiões do DNA que regulam a expressão de proteínas envolvidas no metabolismo da vitamina D. Contudo, observam-se controvérsias sobre a influência dos polimorfismos nas ações fisiológicas e preventivas, denotando a necessidade de investigações mais detalhadas sobre a interação entre a vitamina D com genes correlatos.

Ainda, em função da importância de fatores ambientais e de estilo de vida que interferem na síntese da vitamina D, mais estudos prospectivos da interação genes-nutrientes em diferentes populações são necessários para avaliar os efeitos clínicos e metabólicos da adequação das concentrações séricas da vitamina D na redução do risco e no tratamento de doenças crônicas. Assim, a busca por informações novas ou complementares acerca de três pilares que atuam na regulação da expressão de genes envolvidos de alguma forma com o metabolismo da vitamina D – meio ambiente, genética e epigenética – adi-

cionará perspectivas para a redução do risco e o tratamento de doenças crônicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chiellini G, DeLuca HF. The importance of stereochemistry on the actions of vitamin D. Curr Top Med Chem. 2011;11(7):840-59.
2. Holick MF, Chen TC, Lu Z, Sauter E. Vitamin D and skin physiology: a D-lightful story. J Bone Miner Res. 2007;22(Suppl 2):V28-33.
3. Faibish D, Boskey A. Mineralization. In: Feldman D, Glorieux F, Pike JW (eds.). Vitamin D. New York: Elsevier; 2005.
4. Kimball S, Fuleihan Gel-H, Vieth R. Vitamin D: a growing perspective. Crit Rev Clin Lab Sci. 2008;45(4):339-414.
5. Holick MF. Vitamin D: extraskeletal health. Rheum Dis Clin North Am. 2012;38:141-60.
6. Lamprecht SA, Lipkin M. Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: molecular mechanisms. Nat Rev Can-cer. 2003;3(8):601-14.
7. Hossein-Nezhad A, Spira A, Holick MF. Influence of vitamin D status and vitamin D3 supplementation on genome wide expression of white blood cells: a randomized double-blind clinical trial. PLoS One. 2013;8(3):e58725.
8. Zmuda JM, Cauley JA, Ferrell RE. Molecular epidemiology of vitamin D receptor gene variants. Epidemiol Rev. 2000;22:2013-17.
9. Gnagnarella P, Pasquali E, Serrano D, Raimondi S, Disalvatore D, Gandini S2. Vitamin D receptor polymorphism FokI and cancer risk: a comprehensive meta-analysis. Carcinogenesis. 2014;35(9):1913-9.
10. Tizaoui K, Berraies A, Hamdi B, Kaabachi W, Hamzaoui K, Hamzaoui A. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with asthma risk: systematic review and updated meta-analysis of case-control studies. Lung. 2014;192(6):955-65.
11. Moy KA, Mondul AM, Zhang H, Weinstein SJ, Wheeler W, Chung CC et al. Genome-wide association study of circulating vitamin D-binding protein. Am J Clin Nutr. 2014;99(6):1424-31.
12. Ahn J, Yu K, Stolzenberg-Solomon R, Simon KC, McCullough ML, Gallicchio L et al. Genome-wide association study of circulating vitamin D levels. Hum Mol Genet. 2010;19(13):2739-45.
13. Gröber U, Spitz J, Reichrath J, Kisters K, Holick MF. Vitamin D: Update 2013: From rickets prophylaxis to general preventive healthcare. Dermatoendocrinol. 2013;5(3):331-47.
14. Wang Y, Zhu J, Deluca HF. Where is the vitamin receptor? Arch Biochem Biophys. 2012;523:123-33.
15. Fetahu IS, Höbaus J, Kállay E. Vitamin D and the epigenome. Front Physiol. 2014;5:164.
16. Vasilopoulos Y, Sarafidou T, Kotsa K, Papadimitriou M, Goutzelas Y, Stamatis C et al. VDR TaqI is associated with obesity in the Greek population. Gene. 2013;512(2):237-39.
17. Ye WZ, Reis AF, Dubois-Laforgue D, Bellanné-Chantelot C, Timsit J, Velho G. Vitamin D receptor gene polymorphisms are asso-ciated with obesity in type 2 diabetic subjects with early age of onset. Eur J Endocrinol. 2001;145(2):181-86.
18. Blumberg JM, Tzameli I, Astapova I, Lam FS, Flier JS, Hollenberg AN. Complex role of the vitamin D receptor and its ligand in adi-pogenesis in 3T3-L1 cells. J Biol Chem. 2006;281(16):11205-13.
19. Malloy PJ, Feldman BJ. Cell-autonomous regulation of brown fat identity gene UCP1 by unliganded vitamin D receptor. Mol Endo-crinol. 2013;27(10):1632-42.
20. Shi H, Norman AW, Okamura WH, Sen A, Zemel MB. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits uncoupling protein 2 expression in human adipocytes. FASEB J. 2002;16(13):1808-10.
21. Creely SJ, McTernan PG, Kusminski CM, Fisher M, Da Silva NF et al. Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2007;292:E740-E747.
22. Sadeghi K, Wessner B, Laggner U, Ploder M, Tamandl D et al. Vitamin D3 down-regulates monocyte TLR expression and triggers hyporesponsiveness to pathogen-associated molecular patterns. Eur J Immunol. 2006,36:361-70.
23. Hossein-nezhad A, Holick MF. Optimize dietary intake of vitamin D: an epigenetic perspective. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2012;15(6):567-79.
24. Tamer G, Mesci B, Tamer I, Kilic D, Arik S. Is vitamin D deficiency an independent risk factor for obesity and abdominal obesity in women? Endokrynol Pol. 2012,63:196-201.
25. Deeb KK, Trump DL, Johnson CS. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. Nat Rev Cancer. 2007;7(9):684-700.
26. Pittas AG, Lau J, Hu FB, Dawson-Hughes B. The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis. J Clin Endocrinol Metab. 2007;92(6):2017-29.
27. Querfeld U, Hoffmann MM, Klaus G, Eifinger F, Ackerschott M, Michalk D et al. Antagonistic effects of vitamin D and parathyroid hormone on lipoprotein lipase in cultured adipocytes. Journal of the American Society of Nephrology. 1999;10:2158-64.
28. Hitman GA, Mannan N, McDermott MF, Aganna E, Ogunkolade BW, Hales CN et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms infuence insulin secretion in Bangladeshi Asians. Diabetes. 1998;47:688-90.
29. Oh JY, Barrett-Connor E. Association between vitamin D receptor polymorphism and type 2 diabetes or metabolic syndrome in community-dwelling older adults: the Rancho Bernardo Study. Metabolism. 2002;51(3):356-59.
30. Ogunkolade BW, Boucher BJ, Prahl JM, Bustin SA, Burrin JM, Noonan K et al. Vitamin D receptor (VDR) mRNA and VDR protein levels in relation to vitamin D status, insulin secretory capacity, and VDR genotype in Bangladeshi Asians. Diabetes. 2002;51(7):2294-300.
31. Chiu KC, Chuang LM, Yoon C. The vitamin D receptor polymorphism in the translation initiation codon is a risk factor for insulin resistance in glucose tolerant Caucasians. BMC Med Genet. 2001;2:2.
32. Mauricio D, Mandrup-Poulsen T, Nerup J. Vitamin D analogues in insulin-dependent diabetes mellitus and other autoimmune diseases: a therapeutic perspective. Diabetes Metab Rev. 1996;12(1):57-68.
33. Dawson-Hughes B, Harris SS, Finneran S. Calcium absorption on high and low calcium intakes in relation to vitamin D receptor genotype. J Clin Endocrinol Metab. 1995;80(12):3657-61.
34. Ortlepp JR, Metrikat J, Albrecht M, von Korff A, Hanrath P, Hoffmann R. The vitamin D receptor gene variant and physical activity predicts fasting glucose levels in healthy young men. Diabet Med. 2003;20(6):451-54.
35. Ortlepp JR, Lauscher J, Hoffmann R, Hanrath P, Joost HG. The vitamin D receptor gene variant is associated with the prevalence of type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. Diabet Med. 2001;18(10):842-45.
36. Arai H, Miyamoto KI, Yoshida M, Yamamoto H, Taketani Y, Morita K et al. The polymorphism in the caudal-related homeodomain protein Cdx-2 binding element in the human vitamin D receptor gene. J Bone Miner Res. 2001;16(7):1256-64.
37. Wehr E, Trummer O, Giuliani A, Gruber HJ, Pieber TR, Obermayer-Pietsch B. Vitamin D-associated polymorphisms are related

to insulin resistance and vitamin D deficiency in polycystic ovary syndrome. Eur J Endocrinol. 2011;164(5):741-49.
38. Li L, Wu B, Liu JY, Yang LB. Vitamin D receptor gene polymorphisms and type 2 diabetes: a meta-analysis. Arch Med Res. 2013;44(3):235-41.
39. John EM, Schwartz GG, Koo J, Van Den Berg D, Ingles SA. Sun exposure, vitamin D receptor gene polymorphisms, and risk of advanced prostate cancer. Cancer Res. 2005;65(12):5470-79.
40. Slattery ML, Sweeney C, Murtaugh M, Ma KN, Caan BJ, Potter JD et al. Associations between vitamin D, vitamin D receptor gene and the androgen receptor gene with colon and rectal cancer. Int J Cancer. 2006;118(12):3140-46.
41. Kunutsor SK, Apekey TA, Steur M. Vitamin D and risk of future hypertension: meta-analysis of 283,537 participants. Eur J Epidemiol. 2013;28(3):205-21.
42. Burgaz A, Orsini N, Larsson SC, Wolk A. Blood 25-hydroxyvitamin D concentration and hypertension: a meta-analysis. J Hypertens. 2011;29(4):636-45.
43. Lee JH, O'Keefe JH, Bell D, Hensrud DD, Holick MF. Vitamin D deficiency an important, common, and easily treatable cardiovascu-lar risk factor? J Am Coll Cardiol. 2008;52(24):1949-56.
44. Reid IR, Bolland MJ. Role of vitamin D deficiency in cardiovascular disease. Heart. 2012;98:609-14.
45. Sugden JA, Davies JI, Witham MD, Morris AD, Struthers AD. Vitamin D improves endothelial function in patients with Type 2 dia-betes mellitus and low vitamin D levels. Diabet Med. 2008;25(3):320-25.
46. Chiu KC, Chu A, Go VLW, Saad MF. Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction. Am J Clin Nutr. 2004;79(5):820-25.
47. Franczyk A, Stolarz-Skrzypek K, Wesołowska A, Czarnecka D. Vitamin D and vitamin D receptor activators in treatment of hyper-tension and cardiovascular disease. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets. 2014;14(1):34-44.
48. Swapna N, Mohana Vamsi U, Usha G, Padma T. Risk conferred by FokI polymorphism of vitamin D receptor (VDR) gene for essen-tial hypertension. Indian J Hum Genet. 2011;17:201-06.
49. Muray S, Parisi E, Cardús A, Craver L, Marco MP, Fernández E. Influence of the vitamin D receptor gene polymorphism and 25-hydroxyvitamin D on arterial pressure in health individuals. Nefrologia. 2003;23(Suppl 2):32-6.
50. Park HY, Kim JH, Bae S, Choi YY, Park JY, Hong YC. Interaction effect of serum 25-hydroxyvitamin D levels and CYP1A1, CYP1B1 polymorphisms on blood pressure in an elderly population. J Hypertens. 2015;33(1):69-76.
51. Wang L, Chu A, Buring JE, Ridker PM, Chasman DI, Sesso HD. Common genetic variations in the vitamin D pathway in relation to blood pressure. Am J Hypertens. 2014;27(11):1387-95.
52. Kunutsor SK, Burgess S, Munroe PB, Khan H. Vitamin D and high blood pressure: causal association or epiphenomenon? Eur J Epi-demiol. 2014;29(1):1-14.
53. Borges MC, Martini LA, Rogero MM. Current perspectives on vitamin D, immune system, and chronic diseases. Nutrition. 2011;27(4):399-404.
54. Fritsche J, Mondal K, Ehrnsperger A, Andreesen R, Kreutz M. Regulation of 25-hydroxyvitamin D3–1a-hydroxylase and production of 1a, 25-dihydroxyvitamin D3 by human dendritic cells. Blood. 2003;102:3314-16.
55. van Etten E, Mathieu C. Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3: basic concepts. J Steroid Biochem Mol Biol. 2005;97:93-101.
56. Bowen H, Kelly A, Lee T, Lavender P. Control of cytokine gene transcription in Th1 and Th2 cells. Clin Exp Allergy 2008;38:1422-31.
57. Zhu J, Yamane H, Cote-Sierra J, Guo L, Paul WE. GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. Cell Res. 2006;16:3-10.
58. Cohen-Lahav M, Shany S, Tobvin D, Chaimovitz C, Douvdevani A. Vitamin D decreases NFkappaB activity by increasing Ikappa-Balpha levels. Nephrol Dial Transplant 2006;21:889-97.
59. Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in theimmunesystem. Ann Rev Immunol. 2009;27:693-733.
60. Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimi-crobial response. Science. 2006;311:1770-73.
61. Trembleau S, Penna G, Bosi E, Mortara A, Gately MK, Adorini L. Interleukin 12 administration induces T helper type 1 cells and accelerates autoimmune diabetes in NOD mice. J Exp Med. 1995;181:817-21.
62. Gregori S, Giarratana N, Smiroldo S, Uskokovic M, Adorini LA. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) analog enhances regulatory T-cells and arrests autoimmune diabetes in NOD mice. Diabetes. 2002;51:1367-74.
63. Yu S, Cantorna MT. Epigenetic reduction in invariant NKT cells following in utero vitamin D deficiency in mice. J Immunol. 2011;186(3):1384-90.
64. Stubbins RE, Habeem A, Núñez NP. Using components of the vitamin D pathway to prevent and treat colon cancer. Nutr. Vev. 2012;70(12):721-9.
65. Essa S, Denzer N, Mahlknecht U, Klein R, Collnot EM, Tilgen W et al. VDR microRNA expression and epigenetic silencing of vitamin D signaling in melanoma cells. J Steroid Biochem Mol Biol. 2010;121(1-2):110-3.
66. Essa S, Reichrath S, Mahlknecht U, Montenarh M, Vogt T, Reichrath J. Signature of VDR miRNAs and epigenetic modulation of vitamin D signaling in melanoma cell lines. Anticancer Res. 2012;32(1):383-89.
67. Xu Y, He B, Pan Y, Deng Q, Sun H, Li R et al. Systematic review and meta-analysis on vitamin D receptor polymorphisms and cancer risk. Tumour Biol. 2014;35(5):4153-69.
68. Gorham ED, Garland CF, Garland FC, Grant WB, Mohr SB, Lipkin M et al. Vitamin D and prevention of colorectal cancer. J Steroid Biochem Mol Biol. 2005;97(1-2):179-94.
69. Giovannucci E, Liu Y, Rimm EB, Hollis BW, Fuchs CS, Stampfer MJ et al. Prospective study of predictors of vitamin D status and cancer incidence and mortality in men. J Natl Cancer Inst. 2006;98(7):451-9.
70. Wacker M, Holick MF. Vitamin D - effects on skeletal and extraskeletal health and the need for supplementation. Nutrients. 2013;5(1):111-48.
71. Mencej-Bedrac S1, Prezelj J, Kocjan T, Teskac K, Ostanek B, Smelcer M et al. The combinations of polymorphisms in vitamin D receptor, osteoprotegerin and tumour necrosis factor superfamily member 11 genes are associated with bone mineral density. J Mol Endocrinol. 2009;42(3):239-47.
72. Ralston SH, de Crombrugghe B. Genetic regulation of bone mass and susceptibility to osteoporosis. Genes Dev. 2006;20(18):2492-506.
73. Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen TV et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. Natu-re. 1994;367(6460):284-87.
74. Urano T, Inoue S. Genetics of osteoporosis. Biochem Biophys Res Commun. 2014;452(2):287-93.

75. Thakkinstian A, D'Este C, Eisman J, Nguyen T, Attia J. Meta analysis of molecular association studies: vitamin D receptor gene polymorphisms and BMD as a case study. J BoneMiner Res. 2004;19:419-28.
76. Gong G, Stern HS, Cheng SC, Fong N, Mordeson J, Deng HW, Recker RR. The association of bone mineral density with vitamin D receptor gene polymorphisms. Osteoporos Int. 1999;9(1):55-64.
77. Cooper GS, Umbach DM. Are vitamin D receptor polymorphisms associated with bone mineral density? A meta-analysis. J Bone Miner Res. 1996; 11(12):1841-9.
78. Singh M, Singh P, Singh S, Juneja PK, Kaur T. Vitamin D receptor (VDR) gene polymorphism influences the risk of osteoporosis in postmenopausal women of Northwest India. Arch Osteoporos. 2013;8(1-2):147.
79. Li Y, Xi B, Li K, Wang C. Association between vitamin D receptor gene polymorphisms and bone mineral density in Chinese women. Mol Biol Rep. 2012;39:5709-17.
80. Thakkinstian A, D'Este C, Attia J. Haplotype analysis of VDR gene polymorphisms: a meta-analysis. Osteoporos Int. 2004;15:729-34.
81. Qin G, Dong Z, Zeng P, Liu M, Liao X. Association of vitamin D receptor BsmI gene polymorphism with risk of osteoporosis: a me-ta-analysis of 41 studies. Mol Biol Rep. 2013;40:497-506.
82. Fang Y, Rivadeneira F, van Meurs JB, Pols HA, Ioannidis JP, Uitterlinden AG. Vitamin D receptor gene BsmI and TaqI polymorphisms and fracture risk: a meta-analysis. Bone. 2006;39:938-45.
83. Uitterlinden AG, Ralston SH, Brandi ML et al. The association between common vitamin D receptor gene variations and osteoporo-sis: a participant-level meta-analysis. Ann Intern Med. 2006;145:255-64.
84. Hossein-Nezhad A, Holick MF. Vitamin D for health: a global perspective. Mayo Clin Proc. 2013;88(7):720-55.
85. Bocheva G, Boyadjieva N. Epigenetic regulation of fetal bone development and placental transfer of nutrients: progress for osteoporosis. Interdiscip Toxicol. 2011;4(4):167-72.
86. Javaid MK, Crozier SR, Harvey NC, Gale CR, Dennison EM, Boucher BJ et al. Princess Anne Hospital Study Group. Maternal vitamin D status during pregnancy and childhood bone mass at age 9 years: a longitudinal study. Lancet. 2006;367(9504):36-43.

Diabete melito tipo 2 | 22

José Rodrigo Pauli
Guilherme Pedron Formigari
Dennys Esper Cintra

INTRODUÇÃO

Neste capítulo, serão abordados aspectos relativos à fisiopatogênese do diabete melito tipo 2 (DM2), com enfoque em aspectos de genômica nutricional. O DM2 é uma doença insidiosa e assintomática que apresenta altas taxas de comorbidades e mortalidade e grande prevalência em todo o mundo.[1] O excesso de gordura corporal está associado ao aumento do risco de desenvolver resistência à ação da insulina (condição designada pré-diabetes) e DM2, em um fenômeno chamado "diabesidade".[2] O tecido adiposo, especialmente localizado na região visceral do corpo, libera biomoléculas como ácidos graxos livres (AGL), glicerol, hormônios, citocinas pró-inflamatórias e outros fatores que estão envolvidos na indução da resistência à insulina. Dada a gravidade de complicações e o impacto desse tipo de tecido, o termo adiposopatia tem sido utilizado. Nesse cenário, quando a resistência à ação do hormônio insulina é associada à disfunção das células beta do pâncreas, ocorre decréscimo na sua secreção e, como resultado, descontrole do metabolismo, especialmente de carboidratos, culminando em hiperglicemia.

O conhecimento adquirido nas últimas décadas permite considerar que o prejuízo na ação da insulina pode ocorrer após a ingestão de dietas ricas em lipídios, com predominância de ácidos graxos saturados, os quais são capazes de ativar receptores de membrana denominados receptores do tipo *Toll* (TLR), tanto o TLR2 quanto o TLR4, e aumentar a expressão de proteínas pró-inflamatórias. O TLR2 e o TLR4 são capazes de reconhecer o lipopolissacarídeo (LPS) presente na parede celular de bactérias Gram-negativas e induzir a ativação do sistema imune.[3] Esses mesmos receptores, porém, ao reconhecerem alguns tipos de ácidos graxos saturados, induzem um estado inflamatório crônico e de baixa intensidade no qual não há processo infeccioso (pseudoinfecção), mas que, no entanto, culminará com prejuízos na transdução do sinal da insulina, conforme será detalhado neste capítulo. Não apenas tecidos periféricos são acometidos pelos danos de uma resistência à transdução dos sinais da insulina, mas o sistema nervoso central também sofre graves consequências. Atualmente, áreas como a amígdala, o fórnix, o *striatum*, o hipocampo e até mesmo o cerebelo são estudadas em relação aos danos que a inflamação pode causar ao impedir que a sinalização da insulina ocorra; contudo, o hipotálamo é o grande alvo de estudo, em razão de seu papel preponderante como centro regulador da fome.[4] Como a insulina tem efeito anorexigênico, sua função prejudicada pelo estado inflamatório de baixa intensidade conduz à hiperfagia e à concomitante redução do gasto energético, contribuindo significativamente para o desenvolvimento da obesidade.

À luz desses resultados, o conhecimento em biologia molecular associado a outras áreas de estudo tenta nortear quais fatores seriam mais relevantes no processo da gênese do DM2. Este capítulo tem o propósito de destacar os avanços obtidos na tentativa de auxiliar profissionais das mais diversas áreas de saúde a conhecer a etiologia e a fisiopatologia da resistência à insulina e do DM2, com enfoque em mecanismos relacionados à genômica nutricional.

RESISTÊNCIA À INSULINA EM TECIDOS PERIFÉRICOS E CENTRAL

Aspectos gerais

A insulina é um hormônio anabólico com ações fundamentais em tecidos e órgãos, promovendo a manuten-

ção da homeostase orgânica.[5] Anormalidades na ação da insulina em estimular a captação de glicose no músculo esquelético e no tecido adiposo; em inibir a produção hepática de glicose e a lipólise; e em controlar a ingestão alimentar, em geral, estão presentes em indivíduos com resistência à insulina e antecedem o desenvolvimento do DM2. Houve avanços quanto à compreensão da resistência à insulina em tecidos específicos por meio do uso de modelos animais de experimentação e de tecnologias de biologia molecular e genética. Além disso, as pesquisas em seres humanos com utilização de biópsia de alguns tecidos têm contribuído para desvendar os mecanismos envolvidos na resistência à ação da insulina e no desenvolvimento do DM2.

As evidências sobre músculo e fígado foram rapidamente descritas, provavelmente em razão dos desdobramentos metabólicos que esses tecidos apresentavam perante o metabolismo de nutrientes. Até então, o tecido adiposo era conhecido como simples tecido de armazenamento de lipídios, ficando "à deriva" nas especulações mecanísticas acerca da obesidade e também do DM2. Inicialmente, acreditou-se que o tecido adiposo precisaria estar hipertrofiado e densamente rico em conteúdo lipídico para que a obesidade apresentasse repercussões em outros tecidos. Nesse momento, surgiram as hipóteses, posteriormente comprovadas, de que sua hipertrofia seria o fenômeno responsável pela atração de células do sistema imune, em particular macrófagos, que iniciariam ou intensificariam o processo inflamatório local, ocasionando, mais tarde, uma resposta inflamatória sistêmica.[6,7]

Músculo esquelético

O músculo esquelético tem grande importância na homeostase glicêmica do organismo, uma vez que responde por aproximadamente 80% da utilização da glicose no período pós-prandial. Na condição basal, é necessária a presença de insulina para que ocorra captação muscular de glicose. Por isso, qualquer redução na capacidade da insulina em estimular a captação de glicose nesse tecido é relevante para o controle da glicemia corporal total.[5]

Experimentos com camundongos transgênicos auxiliaram na elucidação do papel da insulina sobre a captação de glicose no músculo esquelético, fornecendo informações sobre quais vias alternativas poderiam compensar a inexistência da ação desse hormônio. Por exemplo, a inativação do receptor de insulina (IR, *insulin receptor*) no músculo esquelético originou um modelo animal com risco cardiometabólico, com aumento dos depósitos de gordura corporal e de triacilgliceróis circulantes. Esses animais, denominados Mirko (*muscle-specific insulin receptor knockout*), não desenvolveram hiperinsulinemia e diabete, indicando que poderia haver rotas alternativas de captação de glicose no músculo ou desvio apropriado dessa hexose para o tecido adiposo.[8] Por outro lado, a deleção do gene do transportador de glicose do tipo 4 (Glut4, *glucose transporter type 4*) no músculo esquelético é capaz de dar origem ao diabete grave. Isso mostra que o GLUT4 é um componente fundamental para a captação de glicose no músculo esquelético.[9]

Descobertas posteriores mostraram que duas diferentes vias têm efeito potencial na captação de glicose na ausência do receptor de insulina, sendo uma estimulada pela contração muscular com ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK), e outra pela sinalização do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF1, *insulin-like growth fator 1*), que podem compensar a ausência do IR.[10,11] Em resposta à contração do músculo esquelético, ocorre a ativação da AMPK, intacta nos animais Mirko, a qual estimula a translocação do GLUT4 para a membrana da célula.

A importância da participação do IGF1 na entrada de glicose no músculo esquelético foi comprovada por meio de experimentos com deleção combinada dos genes do IR e do IGF, nos quais os camundongos manifestaram o fenótipo do DM2. Vale ressaltar que existe alta homologia entre IGF1 e insulina, ou seja, há grande semelhança estrutural no que se refere às suas sequências de aminoácidos. Assim como os hormônios, seus receptores de membrana (IGF1R e IR) também são semelhantes, e isso permite que ambos os hormônios se liguem aos seus receptores com alta afinidade e ao receptor do outro hormônio com menor afinidade. Portanto, na deficiência do IR, a ligação da insulina pode ocorrer por meio do receptor de IGF, permitindo, ao menos em parte, a sinalização e os efeitos biológicos desse hormônio.[11]

Nesse contexto e considerando aspectos de nutrigenômica, vale ressaltar a importância da diferença entre as moléculas descritas. Em geral, o conhecimento sobre vias de sinalização celular baseia-se em proteínas consideradas "clássicas" de determinada via. Ressalta-se aqui o fato de que muitas proteínas apresentam mais de uma função, ou seja, dependendo da situação, elas podem adquirir caráter coparticipativo em outras vias, o que ocorre com o IR e o receptor do IGF1 (IGF1R). A insulina, quando em concentração elevada, pode ativar o IGF1R, mesmo ele não sendo específico para a insulina. A consequência disso pode ser desastrosa. Caso uma célula tumoral expresse tal receptor, isso pode acelerar o crescimento do tumor por aumentar a sua capacidade de captação de glicose. Tal fato representa um alerta aos praticantes de atividade física que fazem uso recorrente da insulina sem necessidade

(sem apresentar DM1), no intuito de obter hipertrofia muscular.[12]

As informações decorrentes de estudos experimentais permitiram compreender que, no músculo esquelético, há caminhos alternativos para a translocação do GLUT4 à membrana plasmática para a captação de glicose, compensando sua captação nos camundongos que não apresentavam o IR. No entanto, a captação de glicose em músculo esquelético de pacientes diabéticos se mostra reduzida em comparação aos seus controles saudáveis. Tal fato indica que o prejuízo na captação da glicose no músculo contribui para o prejuízo do controle da glicemia nos pacientes diabéticos.[13]

Pacientes obesos e diabéticos apresentam menor ação da insulina no músculo esquelético, com alterações observadas na cascata de sinalização desse hormônio. Esses indivíduos apresentam menor fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina 1 (IRS1) e redução da atividade da fosfatidil inositol 3 quinase (PI3K) no músculo esquelético.[14] Isso explica, em parte, o prejuízo na entrada de glicose estimulada por insulina no tecido muscular. Essas alterações na via de sinalização da insulina estão relacionadas a condições metabólicas, como aumento das concentrações de AGL circulantes e da deposição intracelular de lipídios e indução de inflamação nos tecidos periféricos (p. ex., músculo esquelético) de indivíduos com DM2. O excesso de gordura corporal, em humanos e animais, está associado à inflamação de baixa intensidade e à síntese de citocinas pró-inflamatórias pelos adipócitos, com infiltração de macrófagos que intensificam a alteração na capacidade de transdução do sinal da insulina, o que, consequentemente, reduz a captação de glicose. Além disso, ao menos em modelos animais de obesidade induzida por ração rica em lipídios, verifica-se diminuição da expressão gênica e do conteúdo proteico da AMPK e do IGF1, sugerindo que vias alternativas para a captação de glicose também podem ser comprometidas pela obesidade.[15, 16]

Ademais, já é conhecido que outras biomoléculas estão relacionadas à captação de glicose no músculo esquelético. Em resposta à contração muscular, proteínas quinases dependentes de cálcio/calmodulina (CaMKK – cálcio-calmodulina quinase) são ativadas, e esse mecanismo relaciona-se à translocação de GLUT4 para a membrana celular com consecutiva captação de glicose.[17] O aumento da expressão gênica da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e da produção de óxido nítrico (NO, *nitric oxide*) está associado também ao aumento na captação da glicose.[18]

Outras vias alternativas foram descobertas ao longo dos anos. A Cbl (proto-oncogene) e a CAP (proteína associada à Cbl), por exemplo, parecem ser não dependentes da ativação de PI3K. Após a ligação da insulina ao seu receptor, ocorre uma cascata de sinalização intracelular e, por meio dessas proteínas, há aumento da translocação de GLUT4 e posterior captação de glicose. Embora a via CAP-Cbl não se mostre tão relevante no músculo esquelético, no tecido adiposo ela parece exercer papel crucial na captação de glicose. Essas descobertas mostram que o sistema de captação de glicose é complexo e envolve inúmeras moléculas.[19]

Tecido adiposo

No tecido adiposo, a ineficácia da ação da insulina promove o aumento da lipólise, resultando em concentração elevada de AGL e de triacilgliceróis circulantes. Similarmente, em indivíduos obesos resistentes à insulina ou com DM2, a ausência do efeito supressivo da insulina sobre a lipólise provoca aumento na circulação de AGL. Para determinação dos efeitos da via de sinalização da insulina no tecido adiposo sobre o metabolismo de lipídios e de carboidratos, foi gerado outro modelo de camundongo transgênico *knockout* que não expressa o IR em tecido adiposo branco e marrom e apresenta redução acentuada de massa adiposa gonadal e conteúdo de triacilgliceróis no corpo. Além disso, o camundongo com deleção do IR apenas nos adipócitos, denominado de Firko (*fat-specific insulin receptor knockout*), é resistente ao ganho de peso relacionado à idade ou às alterações hipotalâmicas que induzem hiperfagia. Além disso, quando esses animais são expostos a uma ração rica em lipídios, não apresentam intolerância à glicose. Portanto, embora a ação específica da insulina sobre adipócitos seja necessária para o armazenamento de triacilgliceróis (lipogênese), esse hormônio pode não ser fundamental para o metabolismo da glicose.[20]

Ao contrário, quando foi realizada a deleção do gene que codifica o GLUT4 especificamente no tecido adiposo, os animais apresentaram resistência à insulina tanto no músculo esquelético como no fígado, bem como intolerância à glicose. Em contrapartida, não foram identificadas concentrações elevadas de ácidos graxos circulantes no período de jejum, mostrando que a insulina suprimiu adequadamente a lipólise.[21]

Esses resultados são indicativos de que a resistência à insulina observada nos camundongos está atrelada à hiperinsulinemia crônica ou à secreção aumentada de fatores derivados do tecido adiposo, demonstrando que a captação aumentada de glicose e a hipertrofia do tecido adiposo podem ter efeito protetor contra os efeitos do excesso de AGL circulantes. Essa consideração tem suporte em experimentos em animais com superexpressão de GLUT4 no tecido adiposo, que apresentam melhora da sensibilidade à insulina no organismo como um todo.[22] Entretanto, na obesidade, a manutenção do processo

inflamatório induz resistência à insulina no tecido adiposo com prejuízo na captação de glicose e na lipogênese.[23]

Tecido hepático

O papel da insulina em regular diretamente a produção hepática de glicose tem sido intensamente investigado, uma vez que ela tem papel supressivo na gliconeogênese hepática. O efeito da insulina em inibir a proteólise no músculo esquelético e a lipólise no tecido adiposo reduz a oferta de aminoácidos e glicerol para o fígado, diminuindo, portanto, a gliconeogênese.[24]

As manifestações metabólicas decorrentes da ação da insulina no tecido hepático também foram elucidadas por meio do uso de animais geneticamente modificados. A criação do modelo geneticamente modificado de camundongos *knockout* para o IR no fígado, denominado Lirko (*liver-specific insulin receptor knockout*), efetivamente mostrou que a ausência do receptor causa grave resistência à insulina, intolerância à glicose e incapacidade da insulina em suprimir a produção hepática de glicose.[25] Ensaios experimentais adicionais realizados nas últimas décadas demonstram que a presença da insulina é fundamental para a expressão de genes que codificam enzimas envolvidas com a gliconeogênese, como a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e a glicose-6-fosfatase (G6Pase). Prejuízos na propagação do sinal da insulina no fígado na obesidade são capazes de aumentar a produção hepática de glicose e, subsequentemente, causar alteração inicial na glicemia pós-prandial e, tardiamente, na glicemia de jejum.[26] O silenciamento do IR especificamente no tecido adiposo e no músculo esquelético de camundongos, com sinalização normal no fígado, reforçou a importância do tecido hepático na homeostase glicêmica. Já que os camundongos com a sinalização da insulina preservada no fígado não desenvolveram diabete, mas apresentaram apenas comprometimento na tolerância à glicose, é reconhecido que o prejuízo na ação da insulina no fígado seja um componente importante para o desenvolvimento do DM2.[8, 20]

Na condição de obesidade, a sinalização mediada pela insulina está comprometida e, portanto, ocorre menor ativação da proteína quinase B (Akt) e fosforilação do fator de transcrição Box 1 (Foxo1), que permanece no núcleo. Tal fator é o principal responsável pela transcrição de genes que codificam enzimas gliconeogênicas e, estando ele constantemente no núcleo, a gliconeogênese é mantida. Quando o sinal da Akt fosforilada (p-Akt), ou seja, sua forma ativa, chega ao núcleo, ocorre a translocação da Foxo1 para o citoplasma, interrompendo a gliconeogênese. Além disso, observa-se que, na condição de excesso de gordura corporal – portanto, sob estado de inflamação crônica e de baixa intensidade –, a Foxo1 permanece no núcleo e interage com o coativador designado proteína coativadora 1-alfa do receptor ativado por proliferação de peroxissomos gama (PGC1-alfa) e com o fator nuclear de hepatócito 4-alfa (HNF4-alfa), tornando a gliconeogênese ainda mais intensa.[27] Portanto, a deficiência na ação da insulina no fígado contribui para a alteração na concentração de glicose circulante.[28-30]

Tecido cerebral

Estudos que retratam alterações no sistema nervoso central (SNC) são relativamente recentes; contudo, o cérebro é um dos primeiros tecidos a ser afetado pelo excesso de lipídios circulantes e pelo processo inflamatório crônico de baixa intensidade e sistêmico.[6, 7]

A condição na qual o tecido adiposo permaneceu como órgão central responsável pelos desajustes da obesidade e, consecutivamente, do DM2 e demais comorbidades perdurou por anos, até que, em 2005, um importante trabalho demonstrou que o hipotálamo também poderia ser alvo do processo inflamatório e que a resistência à insulina nesse órgão poderia ser o fator desencadeador do descontrole da fome e da termogênese.[31] Na sequência, demonstrou-se que o hipotálamo é, na verdade, o primeiro tecido a reconhecer o excedente de gordura e a sofrer com a inflamação local.[32] Outro importante trabalho demonstrou que o processo inflamatório pode ocorrer com apenas um dia de ingestão de uma dieta rica em ácidos graxos saturados.[33] Quase ao mesmo tempo, em ambiente experimental, demonstrou-se que ácidos graxos saturados infundidos diretamente no hipotálamo apresentavam capacidade de modular a produção hepática de glicose, aumentando a concentração de glicose circulante. Portanto, atualmente, acredita-se que o hipotálamo seja o primeiro tecido a ser afetado e emane seus sinais à periferia. Com a consequente alteração central no controle da fome e na termogênese, o indivíduo se alimenta mais e gasta menos, armazenando mais energia. Na sequência, fígado e músculo são prejudicados praticamente ao mesmo tempo. O tecido adiposo é um dos últimos a sofrer o dano da resistência à insulina, sendo o responsável pela captação de glicose excedente, tanto da ingestão de nutrientes elevada, do sobressalente não captado no músculo (pois esse tecido está resistente à insulina) e do excedente da produção hepática de glicose. Portanto, quando surge a resistência à ação da insulina no tecido adiposo, o dano ao restante do organismo certamente já se encontra em estágio avançado.[32]

O cérebro ocupa lugar de destaque no desenvolvimento da obesidade e do DM2, tendo a insulina papel relevante sobre o hipotálamo, um centro controlador da

fome e da termogênese. A importância da sinalização da insulina no hipotálamo foi investigada em camundongos *knockout* para o IR em neurônios, modelo denominado Nirko (*neuron-specific insulin receptor knockout*). Esses camundongos apresentam aumento da ingestão alimentar e obesidade.[34] Além disso, parece existir importante conexão entre o SNC e o fígado, como descrito anteriormente.

A inibição seletiva da ação da insulina por meio de injeções intracerebroventriculares de oligonucleotídeos bloqueadores do IR diminui dramaticamente a ação exógena da insulina de suprimir a produção hepática de glicose, demostrando papel relevante do sinal da insulina hipotalâmica no controle do metabolismo da glicose hepática.[35] Desse modo, a resistência à insulina no hipotálamo está atrelada à hiperfagia, favorecendo o equilíbrio energético positivo e distúrbios no metabolismo da glicose. Em conjunto, esses dados permitem compreender que a sinalização prejudicada da insulina em diversas células influencia o desenvolvimento de obesidade e DM2.

OBESIDADE COMO FATOR DE RISCO PARA O DIABETE MELITO TIPO 2

O excesso de gordura corporal na obesidade está relacionado a alterações inflamatórias. A relação entre obesidade e diabete pode ser observada por meio das concentrações plasmáticas elevadas de citocinas pró-inflamatórias, como interleucinas 1 beta (IL-1beta) e 6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) e interferon gama (IFN-gama), tanto em adipócitos de seres humanos quanto de animais. Resultados recentes demostraram que a obesidade é caracterizada pelo acúmulo de macrófagos e células adiposas que compartilham a expressão de múltiplos genes, que fornece outra dimensão para o entendimento do desenvolvimento da inflamação relacionada à obesidade. A presença de macrófagos no tecido adiposo auxilia na síntese de mediadores inflamatórios com atividade isolada ou em conjunto com os adipócitos.[3] Portanto, essas células do sistema imune teriam participação fundamental no desenvolvimento da resistência à insulina, conforme será discutido neste capítulo.

Demonstrou-se, por técnicas de imagem, que o tecido adiposo hipertrofiado apresenta aumento na infiltração de macrófagos. Com o início da obesidade, a secreção suprafisiológica de TNF-alfa pelo tecido adiposo estimula os pré-adipócitos a produzir a proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1), uma quimiocina específica para monócitos e macrófagos. Caso haja quantidade suficiente de macrófagos ativados no tecido adiposo na obesidade, eles podem participar tanto do recrutamento de mais macrófagos quanto da produção de citocinas pró-inflamatórias, resultando na resistência à insulina.[36]

A obesidade e, principalmente, a distribuição do tecido adiposo no corpo apresentam estreita relação com o desenvolvimento da resistência à insulina. Os depósitos de gordura visceral (intra-abdominal, mesentéricos e omentais) estão mais fortemente relacionados à resistência à insulina, ao DM2 e às doenças cardiovasculares quando comparados à gordura presente na periferia (glúteos e tecido subcutâneo). Embora não exista consenso de que a gordura localizada na região central seja definitivamente mais prejudicial à saúde metabólica e à sensibilidade à insulina, características dos adipócitos abdominais sugerem que eles desempenham papel importante na alteração da via de sinalização da insulina.[37, 38]

A massa adiposa visceral comparada à gordura subcutânea é mais sensível aos efeitos lipolíticos das catecolaminas e menos sensível ao efeito antilipolítico da insulina. O aumento do fluxo de ácidos graxos provenientes das células adiposas intra-abdominais no sistema porta-hepático pode inibir a liberação de insulina por mecanismos não totalmente conhecidos. Além disso, concentrações mais elevadas de AGL circulantes e no meio intracelular são capazes de exercer efeitos sistêmicos sobre a sensibilidade à insulina, referidos como lipotoxicidade. O papel dos lipídios nas disfunções metabólicas tem sido extensamente considerado; entretanto, o potencial destas no processo inflamatório da obesidade é um conceito recente.[39] Em razão de seu papel relevante no desenvolvimento de resistência à insulina e doenças associadas, a denominação adiposopatia visceral (gordura doente) tem sido utilizada.[40] Sua definição gira em torno do conceito de um tecido funcional e anatomicamente patológico, capaz de causar distúrbios no equilíbrio energético e no metabolismo, resultando em danos graves à saúde.

Concentrações elevadas de AGL circulantes estão associadas a menor fosforilação em sítios específicos e menor ativação de proteínas-chave da via da insulina (IRSs/PI3q). Evidências científicas apontam relação direta entre AGL e resistência à insulina, que pode ser decorrente do acúmulo de triacilgliceróis e de metabólitos derivados de ácidos graxos (diacilglicerol, acetil-CoA e ceramidas) no músculo e no fígado. O aumento desses metabólitos provenientes da oxidação de ácidos graxos no músculo é capaz de provocar a ativação da proteína quinase C (PKC) e/ou da quinase do inibidor do kappa beta (IKK-beta) e da quinase amino-terminal c-Jun (JNK), bem como causar fosforilação em serina do IR e de seus substratos (IRS), sendo estes importantes mecanismos que explicam a relação entre o acúmulo de gordura tecidual e a resistência à insulina. Além disso, evidências verificadas nos últimos anos mostram que fatores circulantes produzidos pelos adipócitos são grandes indutores de resistência à insulina e DM2.[36, 41]

A concentração elevada de AGL na circulação também prejudica os efeitos supressivos da insulina na produção hepática de glicose. Os AGL aumentam a expressão de enzimas gliconeogênicas (p. ex., a glicose-6 fosfatase), aumentando a produção de glicose nos hepatócitos.[42, 43] Assim, os prejuízos provenientes do excesso de AGL circulantes no tecido muscular e hepático, causando captação diminuída de glicose e produção aumentada de glicose, respectivamente, aumentam os riscos de desenvolvimento de DM2.

BASES MOLECULARES DO DESENVOLVIMENTO DA RESISTÊNCIA À INSULINA

O papel endócrino do tecido adiposo no contexto da resistência à insulina

O tecido adiposo é capaz de secretar diversas adipocinas com efeito sistêmico e sobre a sinalização da insulina. Na condição de obesidade, a secreção e a ação das adipocinas, de caráter pró-inflamatório e de efeito negativo sobre a sinalização da insulina, superam a secreção de adipocinas anti-inflamatórias e de efeito positivo ao sinal hormonal. A descoberta de que o tecido adiposo exerce influência sobre o processo de sinalização da insulina ocorreu por meio da identificação da produção do TNF-alfa por adipócitos.[38]

O TNF-alfa é uma das adipocinas com potente perfil inflamatório, produzido por vários tipos de células, mas, principalmente, pelos macrófagos e linfócitos (células do sistema imune). O TNF-alfa, também produzido pelos adipócitos, tem papel crucial na fisiopatologia da resistência à insulina por induzir a fosforilação do IRS-1 em resíduos de serina, na posição 307 do substrato. Quando o IRS-1 é fosforilado nessa posição, ocorre redução de sua interação com o próprio IR, na subunidade beta, e consequentemente a interrupção da transdução do sinal da insulina. De modo consistente com esses resultados, camundongos mutantes que não expressam o gene codificante do TNF-alfa ou os genes dos receptores de TNF-alfa parecem estar protegidos da resistência à insulina, mesmo submetidos ao consumo intenso de ácidos graxos saturados pela ração.[39]

Proteínas com atividade de serinas-quinases

O processo inflamatório induzido por obesidade provoca a ativação de proteínas intermediárias à via de sinalização do TNF-alfa, como as quinases IKK-beta e JNK, identificadas como capazes de fosforilar o IRS-1 em serina 307. Além do efeito direto sobre o IRS-1, a proteína IKK-beta promove a dissociação do complexo IkB-alfa/NF-kB no citoplasma. Com isso, o fator de transcrição NF-kB migra até o núcleo da célula e ativa a transcrição de genes que codificam, por exemplo, IL-1beta, IL-6, MCP1, óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e o próprio TNF-alfa, proteínas que sabidamente exercem efeitos negativos sobre a via de sinalização da insulina.[44]

A interrupção ou a inibição farmacológica da IKK-beta em roedores por meio do ácido acetilsalicílico (AAS) foi capaz de reverter a resistência à insulina induzida por obesidade, o que permitiu a identificação dessa proteína como um contribuinte para resistência à insulina e um potencial alvo terapêutico. No entanto, as doses com efeito potencial em inibir a atividade de tal proteína são praticamente inalcançáveis, sendo ainda desaconselhável seu uso em função das complicações gastrointestinais, como ulceração tecidual.[45]

Outro intermediário de ação relevante na inibição da transdução do sinal da insulina é a JNK, ativada por diversos estímulos, incluindo citocinas, estresse e determinados tipos de ácidos graxos saturados. A atividade serina quinase da JNK é capaz também de fosforilar IRS-1 e IRS-2 na serina da posição 307, comprometendo a fosforilação da tirosina e instalando a resistência à insulina.[14]

Camundongos *knockout* para a JNK exibem menor adiposidade, melhora na sensibilidade à insulina e aumento da capacidade de sinalização do IR, mesmo quando ração rica em lipídios é oferecida aos animais. Essas observações sugerem que a via da JNK é também um importante mecanismo relacionado à resistência à insulina na obesidade.[46]

A secreção de IL-6 e suas concentrações circulantes estão atreladas com a resistência à insulina na obesidade. Os efeitos da IL-6 ocorrem por meio da indução da proteína supressora da sinalização de citocinas (SOCS3). As proteínas SOCS3 são capazes de associar-se fisicamente com proteínas fosforiladas em tirosina, como o IR. Além disso, a SOCS3 reduz a fosforilação em tirosina de IRS-1, demonstrando que essa ligação inibe o acoplamento IRS-1 e IR e a subsequente associação IRS-1/PI3K. Dessa forma, sugere-se que as proteínas SOCS3 sejam potentes inibidores da sinalização da insulina.[47]

O equilíbrio entre a fosforilação e a desfosforilação de proteínas é a base para o controle fisiológico de diversos eventos biológicos disparados por efetores extracelulares, como hormônios, citocinas, neurotransmissores e substâncias ou metabólicos tóxicos. Nesse contexto, a fosforilação e desfosforilação de resíduos de treonina, serina e tirosina em proteínas são eventos essenciais na regulação de divisão, diferenciação e desenvolvimento celular, na regulação do metabolismo, na expressão gênica e na contração, no transporte e na locomoção celular. As atividades de

proteínas quinases e fosfatases são finamente reguladas *in vivo* de maneira que modificações na atividade dessas enzimas proporcionam consequências danosas ao organismo, incluindo distúrbios como DM2.[14]

Proteínas fosfatases

Proteínas tirosinas fosfatases (PTP) são importantes reguladoras de eventos de sinalização celular dependente de fosforilação em tirosina e podem representar novos alvos terapêuticos para o tratamento de várias doenças em humanos. A proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B) é a principal PTP implicada na regulação da ação da insulina e da leptina. Ela é expressa em diferentes tecidos sensíveis à insulina, e diferentes estudos em cultura de células e em roedores indicam que essa enzima se associa ao IR e aos substratos 1 e 2 do receptor de insulina promovendo desfosforilação dessas proteínas, com o intuito de atenuar o sinal da insulina. Esses sinais inibitórios da PTP1B sobre a sinalização da insulina resultam em prejuízos nos diferentes efeitos biológicos desse hormônio de maneira tecido específica, como abordado anteriormente neste capítulo.[48, 49]

Proteínas ancoradouras

Mais recentemente, outras biomoléculas foram descritas como capazes de atenuar o sinal da insulina. Por exemplo, a proteína *Tribbles homolog 3* (TRB3), descoberta em drosófilas, mas com homologia em mamíferos, apresenta efeito supressor sobre a atividade da Akt, predominantemente em condições de jejum e de DM2. Ela exerce efeitos na regulação da sinalização da insulina, uma vez que se liga diretamente à proteína Ser/Thr quinase Akt (Thr308 e Ser473), regiões críticas para a ativação da Akt. A proteína TRB3 se ancora à Akt, impedindo sua fosforilação e ativação e, desse modo, bloqueia consecutivamente as atividades estimuladas pela insulina. Existem evidências de que o aumento de TRB3 na obesidade esteja associado com prejuízos na sinalização da insulina em músculo esquelético e fígado de roedores. Portanto, a TRB3 surge como alvo importante de estudos para intervenções alimentares e medicamentosas, por desempenhar papel de destaque na regulação do sinal da insulina por meio da inibição da fosforilação da quinase Akt.[50, 51]

Estresse de retículo endoplasmático

O estresse de retículo endoplasmático constitui-se em outro mecanismo bastante estudado atualmente na gênese da resistência à insulina. O retículo endoplasmático tem função central na biossíntese de lipídios e de proteínas. No lúmen do retículo, as proteínas assumem sua conformação tridimensional final. Na condição de estresse metabólico, como no estado de obesidade, a homeostase funcional do retículo é rompida, promovendo o acúmulo de proteínas malformadas no seu lúmen. Nessa situação, células em estresse de retículo endoplasmático ativam um complexo sistema de sinalização conhecido como resposta a proteínas mal enoveladas (UPR, *unfolded protein response*). Este seria um mecanismo molecular relevante com repercussão negativa na via de sinalização da insulina.[52]

A UPR atua sobre proteínas malformadas ou mal dobradas, produzidas após intenso processo de transcrição gênica ao qual a célula é submetida quando em estágio inflamatório ou de alto estresse metabólico. Muito se discute sobre o momento de surgimento desse fenômeno, se seria predecessor ou sucessor à inflamação. O que há como evidência provável é que, após o início da inflamação, uma série de novos transcritos primários (RNAm) sejam produzidos a fim de dar origem a proteínas inflamatórias. A maquinaria celular começa a funcionar de forma sobrecarregada e pode entrar em colapso, por não conseguir produzir todo o excedente proteico requerido. A célula, prejudicada por esse excesso, produz proteínas com erros, chamadas de malformadas.[52, 53]

O retículo endoplasmático é uma organela que possui sensores capazes de detectar tais ocorrências e, com isso, inicia-se o processo de estresse do retículo endoplasmático. Em geral, a resposta para isso costuma ser a redução do processo transcricional, para recuperação dos níveis adequados de tradução e síntese proteica. Portanto, a inflamação está associada ao estresse do retículo endoplasmático e à produção de proteínas malformadas, também muito evidentes no processo obesogênico e diabetogênico. Nota-se aqui que esse processo é reversível e tem o intuito de reconduzir a célula para o estado de normalidade. Caso essa estratégia evolutiva falhe, mecanismos de morte celular são ativados. As principais proteínas já caracterizadas e responsivas ao estresse do retículo endoplasmático são IRE-1 (*inositol-requiring enzyme-1*), PERK (*PKR-like endoplasmatic-reticulum kinase*) e ATF-6 (*activating transcription fator 6*).[52]

Componentes da UPR desencadeiam ativação da JNK e do complexo IkB/NF-kB, exacerbando os efeitos inflamatórios da dieta hiperlipídica. Assim, os sinais inflamatórios podem potencializar a retroalimentação no desenvolvimento do estresse do retículo endoplasmático, embora essa questão ainda não esteja totalmente elucidada. A ativação da JNK pela IRE-1 envolve o TRAF2 (*TNF-receptor-associated fator 2*). O complexo IKK/NF-kB pode ser ativado tanto por IRE-1, que interage com a IKK por meio do TRAF2, quanto pela ativação da PERK, que leva à degradação do IkB, facilitando a atividade do NF-kB.[52, 53]

De maneira importante, inibidores do estresse do retículo endoplasmático restauram a sensibilidade à leptina em camundongos submetidos à ração hiperlipídica e atuam na diminuição da ingestão alimentar e do peso corporal em animais obesos.[54, 55] De maneira convergente, a indução do estresse do retículo endoplasmático por meio do antibiótico tunicamicina ou de tapsargina resulta em obesidade, hiperfagia e redução de taxa metabólica basal.[55]

Nitrosação

O fenômeno da S-nitrosação é um mecanismo de resistência à insulina. Na condição de obesidade, há aumento na expressão da enzima iNOS induzido pela ativação do fator de transcrição NF-kB. A iNOS produz NO a partir da conversão de L-arginina em L-citrulina, e é um importante componente do sistema imune inato, tendo sua expressão tecidual aumentada tanto após estímulo com certas interleucinas quanto após infusão de LPS.[56]

Os efeitos negativos da iNOS sobre a via de sinalização da insulina começaram a ser compreendidos no final da década de 1990, quando pesquisadores observaram que tanto o NO liberado por drogas doadoras de NO quanto aquele produzido pela iNOS acarretavam redução da captação de glicose em células musculares, *in vitro* e *in vivo*. Alguns anos depois, demonstrou-se que camundongos geneticamente modificados que não expressam iNOS, apesar de apresentarem aumento da massa corporal quando submetidos ao tratamento com ração hiperlipídica, não desenvolvem resistência à insulina.[57]

Em músculo esquelético, o aumento da iNOS é capaz de induzir resistência à insulina.[58] Testes revelam que, quando as concentrações de TNF-alfa são experimentalmente elevadas, ocorre aumento consecutivo da expressão da iNOS, acompanhado de menor captação de glicose. Ao contrário, drogas que bloqueiam a iNOS, como a aminoguanina ou L-NIL (*N6-(1-iminoethyl)-L-lysine, dihydrochloride*), revertem tais aspectos.[59]

Coletivamente, essas evidências indicam que o NO tem papel crucial no desenvolvimento da resistência à insulina mediada pela iNOS. Além disso, enquanto algumas moléculas agem especificamente sobre apenas um componente da via de sinalização da insulina, a iNOS induzida no estado de obesidade é capaz de liberar NO, que se liga a IR, IRS1, IRS2 e Akt (proteínas essenciais da via de sinalização da insulina), prejudicando a transdução do sinal hormonal, sendo, portanto, um importante mecanismo de resistência à insulina.[58]

É importante documentar que todos os mecanismos apresentados têm seu grau de importância, e que a insulina regula finamente sua sinalização por meio de várias alças de estímulo e resposta (*feedback* negativo). Vários circuitos de controle são necessários para manter a ordem adequada nas múltiplas vias de sinalização ativadas pelo hormônio e, portanto, para permitir uma resposta celular final coordenada.[5, 60]

Se o sinal da insulina fosse continuamente ativado, possivelmente haveria constantes episódios de hipoglicemia. Desse modo, a participação das diferentes proteínas em estimular ou inibir o sinal da insulina é de fundamental importância para a homeostase do organismo. O grande problema é que, quando há indução contínua de uma delas, como acontece na inflamação relacionada à obesidade, o sinal da insulina permanece invariavelmente inibido, e os efeitos são a resistência à insulina, a hiperinsulinemia e a hiperglicemia.[5, 60]

Nesse sentido, parece claro que diversos fatores atuando conjuntamente ou de forma independente podem regular negativamente a ação da insulina, agindo tanto em seu receptor quanto em moléculas pós-receptor. Além disso, deve-se considerar que a obesidade corresponde a uma condição inflamatória de baixa intensidade que promove a produção de fatores pró-inflamatórios envolvidos na origem e permanência da resistência à insulina. A Figura 22.1 ilustra o resumo da maioria das vias de interferência na sinalização da insulina abordadas neste capítulo.

INTEGRAÇÃO IMUNOMETABÓLICA: A HIPÓTESE DO TLR4

Os sistemas imune e metabólico são classificados entre os mais imprescindíveis para a sobrevivência dos mamíferos. Esses dois sistemas se inter-relacionam e apresentam muitas semelhanças. Os macrófagos podem captar e armazenar moléculas de lipídios acumuladas nos vasos sanguíneos, tornando-se células espumosas envolvidas no processo aterosclerótico, enquanto os pré-adipócitos exibem atividade fagocítica e antimicrobiana e até mesmo capacidade de diferenciação em macrófagos. Além disso, a mobilização de energia para combater o agente agressor, por exemplo, é integrante da resposta imunológica normal. Ademais, clinicamente reconhece-se que estados de subnutrição ou má alimentação apresentam efeito supressor sobre o sistema imune.[61, 62]

Além da paridade funcional, numerosos genes que codificam fatores de transcrição, citocinas, moléculas de sinalização inflamatória e transportadores de ácidos graxos essenciais para biologia do adipócito são também expressos e funcionais em macrófagos. Por exemplo, nos macrófagos, ocorre expressão de inúmeros genes característicos do tecido adiposo, como o da proteína transportadora de AGL (FATP) e os dos receptores ativados por proliferador de peroxissomos (PPAR). Em contrapartida, nos adipócitos também são expressos genes

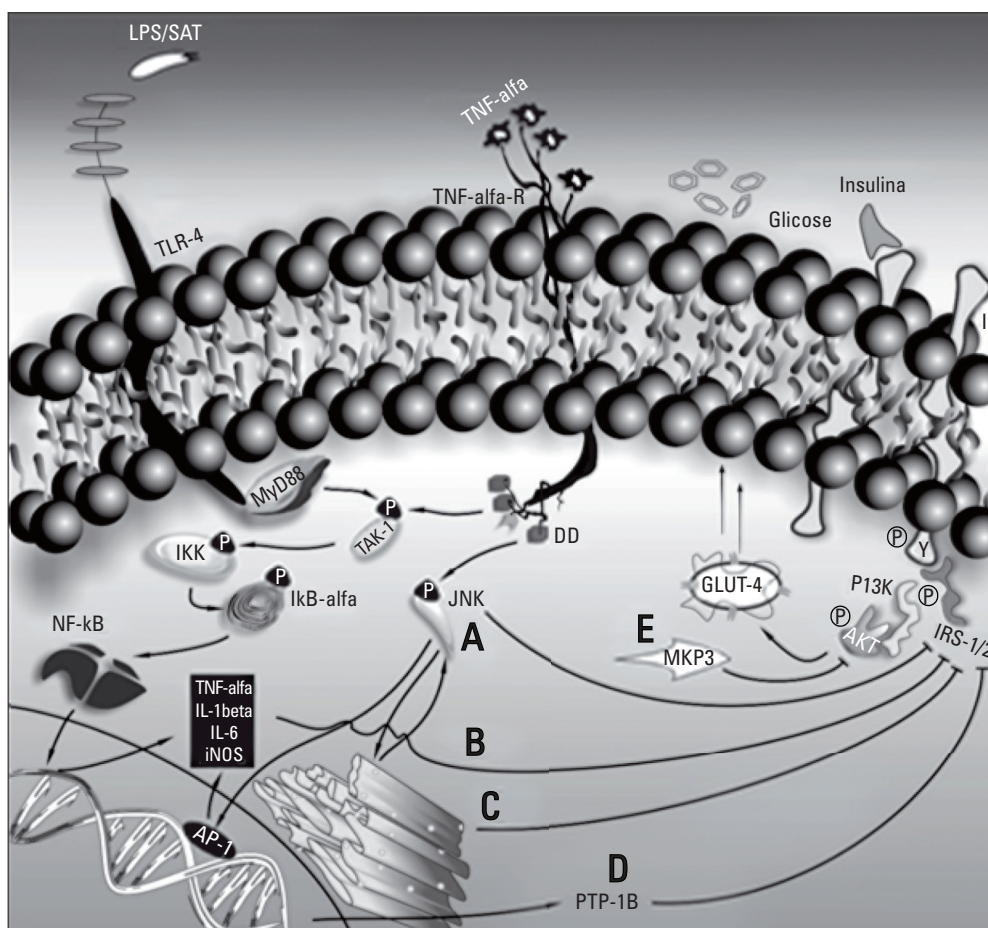



Figura 22.1 Pontos de interferência na via da insulina. (A e B) Proteínas inflamatórias, como a quinase c-Jun N-terminal (JNK) e as citocinas, fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), interleucina 1-beta (IL-1beta) e IL-6, interferem pontualmente na transdução do sinal da insulina, por forçar a fosforilação do substrato do receptor da insulina (IRS-1) em serina, na posição 307. Ainda, a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) é capaz de induzir o processo de nitrosação do receptor de insulina (IR) e de seus substratos, IRS-1/2. (C) O estresse de retículo endoplasmático também interfere indiretamente na sinalização da insulina, por ativar a proteína JNK. (D) A proteína fosfatase 1B (PTP1B) se encontra intensamente ativada no DM2, desativando a via da insulina. (E) A proteína MAP quinase fosfatase 3 (MKP-3) é capaz de interferir fisicamente na proteína quinase B (Akt), impedindo-a de ser fosforilada e ativada, truncando o sinal.[3] AP-1: proteína 1 ativadora; DD: domínio de morte (*death domain*); GLUT 4: transportador de glicose 4; IkB-alfa: inibidor do kappa B alfa; IKK: quinase do inibidor de kappa B; LPS: lipopolissacarídeo; MyD88: fator de resposta à diferenciação mieloide 88; NF-kB: fator nuclear kappa B; P: símbolo de reações que envolvem fosforilação; SAT: ácidos graxos saturados; PI3K: fosfatidil inositol 3 quinase; TAK: proteína quinase ativada por TGF-beta; TLR: receptores do tipo *Toll*; TNF-R: receptor do TNF-alfa; Y: codifica o aminoácido tirosina.

característicos de macrófagos, como aqueles que codificam o TNF-alfa e a IL-6.[62,63]

Esse contexto biológico talvez permita interações contínuas e dinâmicas entre as respostas imune e metabólica, pois o organismo é capaz de elaborar respostas complexas de defesa quando desafiado por diversos tipos de estresse — infecções e escassez calórica. Diante de tais constatações, é possível aventar que vias comuns ou sobrepostas regulem funções imunes e metabólicas por meio de mecanismos de sinalização similares. Isso pode garantir que nutrientes possam interagir com sistemas responsáveis pela detecção de patógenos.[63]

Os TLR foram descobertos na massa branca, componente principal do corpo das drosófilas. A função dessa massa foi definida como de estoque energético da mosca e, por apresentar característica lipídica, foi chamada de corpo gorduroso. Posteriormente, descobriu-se que o corpo gorduroso tinha outras funções nobres além da energética. À estrutura atribuiu-se também responsabilidade sobre os sistemas circulatório, reprodutor e, posteriormente, imune. Acredita-se que a presença dos receptores do tipo TLR em humanos se deva à evolução das espécies: em determinado momento, os sistemas de várias espécies se misturaram e os seres humanos acabaram herdando o gene que codifica tal receptor.[63]

O corpo gorduroso na drosófila é responsável por quase todas as suas funções vitais. Nos humanos, em

razão do processo evolutivo, os sistemas se diferenciaram e se especializaram, tendo-se separado o sistema circulatório do reprodutor, do imune e assim por diante. No entanto, qual seria a explicação para a presença de um receptor de sistema imune em um tecido de estoque como o adiposo, em humanos?[63]

Do ponto de vista prático, esse receptor reconhece patógenos por apresentar afinidade com a estrutura lipídica do LPS. Composto pelos ácidos graxos láurico (C12:0) e mirístico (C14:0), o LPS bacteriano dispara resposta inflamatória intensa e o sistema imune sinaliza para a destruição do microrganismo invasor. Contudo, tais ácidos graxos estão presentes na alimentação humana e, em excesso, podem ativar os receptores TLR2 e TLR4, sem que haja, necessariamente, infecção bacteriana.[64]

Quando o paralelo entre a ingestão de determinados ácidos graxos saturados presentes na alimentação e o processo infeccioso induzido pela presença de LPS oriundo de bactérias Gram-negativas foi traçado, descreveu-se mais um mecanismo de resistência à ação da insulina, pois a partir da ativação dos TLR, proteínas inflamatórias são produzidas, interferindo na sinalização da insulina. A ativação de determinadas quinases na obesidade, especialmente a IKK e a JNK, ressaltam a sobreposição das vias metabólicas e inflamatórias: estas são as mesmas proteínas que são ativadas na resposta imune inata pelo TLR-4 em resposta ao LPS, característico de bactérias Gram-negativas.[65]

No momento em que a alimentação surgiu como potente agente iniciador inflamatório, simulando um estado infeccioso, ainda que de baixa magnitude, demonstrou-se também em humanos que, com apenas um dia de ingestão de uma dieta rica em lipídios, o processo inflamatório é deflagrado. Isso estabeleceu uma ordem importante de entendimento de que a inflamação acontece antes mesmo do desenvolvimento de obesidade e que, uma vez que afeta órgãos e tecidos essenciais ao metabolismo e controle da fome, como o hipotálamo, é um fator desencadeador primário na gênese da resistência à insulina, da obesidade e do DM2.[33]

Como descrito, proteínas como TNF-alfa e IL-1beta iniciam suas vias ativando outras proteínas com atividade de serinas quinases (JNK e IKK beta), fosforilando o receptor de insulina em serina 307 e não em tirosina. De forma especulativa, há uma razão para a ocorrência desse fato. Caso haja realmente um processo infeccioso em curso, é interessante que haja resistência à insulina, pois se a glicose for mantida fora da célula, bactérias perderiam o "interesse" pelo meio intracelular, uma vez que estão em busca de energia e também da maquinaria celular. Ainda assim, caso a bactéria invada a célula, mecanismos pró-oxidativos são ativados com o intuito da criação de um ambiente inóspito a elas. Caso isso não seja suficiente para remissão infecciosa, mecanismos apoptóticos são iniciados, a fim de sacrificar a célula e também o invasor.[62,66]

Tais considerações podem ser reforçadas por experimentos com roedores, nos quais camundongos com mutação genética do TLR-4 utilizam melhor a glicose, apresentam menor depósito de gordura e não desenvolvem resistência à insulina, mesmo quando submetidos à ração rica em lipídios.[67] Além disso, resultados referentes ao uso de drogas inibidoras do TLR-4 mostraram que, ao desativar esse receptor em camundongos diabéticos, ocorre redução na infiltração por macrófagos.[68] Essa é uma possível conexão entre a obesidade e a inflamação de baixa intensidade, subclínica e sistêmica, geralmente observada em indivíduos que estão acima do peso considerado adequado.

Com o avanço das ciências nutricionais, tem sido possível caracterizar as diferentes respostas fenotípicas derivadas de variações genéticas. Mesmo quando nutrientes são oferecidos na mesma quantidade, para uma mesma população, de um mesmo gênero, de mesma etnia, controlando variáveis como massa corporal, estatura ou quaisquer outras, a resposta que se espera mediante o consumo de tal nutriente pode ainda ser diferente. Esse é o desafio que a genômica nutricional tem se proposto a desvendar. Investigações nessa área têm gerado resultados importantes, principalmente relacionados às variações genéticas, com destaque para os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP, *single nucleotide polymorphism*).

NUTRIGENÉTICA E DIABETE MELITO TIPO 2

Variações genéticas e diabete melito tipo 2

Neste capítulo, abordou-se a ativação dos TLR e a forma como o processo inflamatório é deflagrado. A partir da concepção de que esses receptores são ativados também por ácidos graxos saturados oriundos da alimentação, poderiam esses receptores ser ativados sempre na mesma intensidade, em todas as pessoas? O disparo inflamatório seria igual para todos os indivíduos que ingerem, por exemplo, a mesma quantidade de ácidos graxos saturados em sua alimentação? Da mesma forma, pode-se pensar, por exemplo, que um mesmo tratamento medicamentoso, com dose e posologia controladas, exerce melhora de sintomas em um paciente e, por vezes, nenhuma alteração em outro que se encontra sob a mesma terapêutica.

Com o objetivo de apresentar a abordagem sobre a característica de respostas individuais ao tratamento dietoterápico/medicamentoso em pacientes ou populações diabéticas, um exemplo mais detalhado é descrito a se-

guir. Na sequência, apresentam-se exemplos mais pontuais que auxiliam na compreensão da ampla divergência existente perante as respostas orgânicas ao tratamento antidiabético.

Em 2010, um trabalho descreveu situação na qual se observou que pacientes de um ambulatório de DM2 respondiam de forma diferente aos tratamentos medicamentosos ou às alterações de estilo de vida, como prática de atividade física e dieta controlada. Uma parcela daqueles pacientes respondia bem às simples alterações na dieta, com reeducação alimentar e com a inserção da prática de exercícios, ainda que poucas vezes por semana. No entanto, outra parcela respondia mal às alterações nos fatores ambientais, mesmo quando essas modificações eram intensas ou, ainda, associadas à terapêutica medicamentosa. Ainda sob tais condições, a glicemia de jejum ou pós-prandial desses pacientes se mantinha bastante fora dos padrões esperados perante os tratamentos.[69]

Esses pacientes foram separados em dois grupos: os que respondiam bem a qualquer terapêutica e aqueles altamente resistentes à terapêutica, incluindo a medicamentosa. Foram avaliados diversos parâmetros metabólicos e moleculares, mas uma das mais importantes evidências encontradas para explicar tais questões foi a descoberta de polimorfismos no gene do TLR4 dos pacientes que respondiam bem ao tratamento. Os polimorfismos encontrados resultam na troca de uma asparagina por uma glicina na posição 299 (Asp299Gli – rs4986790) e de uma treonina por uma isoleucina na posição 399 (Thr399Ile – rs4986791). Ambos os polimorfismos reduzem a atividade do TLR4, que, por sua vez, reconhece com menos afinidade determinados ácidos graxos da dieta. Desta forma, a resposta inflamatória induzida pela dieta mostrou-se incapaz de causar grandes danos ao metabolismo dos indivíduos carreadores dos polimorfismos. Portanto, o processo inflamatório de baixa intensidade não ocorria de forma determinante para o desenvolvimento da doença em comparação aos indivíduos que não carreavam as variações do gene do TLR4, os quais apresentavam resposta inflamatória intensa.[69]

Indivíduos que portam o polimorfismo no gene do TLR4 apresentam pouca ativação desse receptor mediante a ingestão de ácidos graxos saturados. Assim, a inflamação ocorre de forma bastante atenuada, permitindo que esses indivíduos respondam bem às terapêuticas tradicionais, sendo capazes até mesmo de abandonar os medicamentos hipoglicemiantes.[69]

Os pesquisadores apontaram outro resultado preocupante, uma vez que, com a atividade do principal receptor de sistema imune prejudicada, as respostas a infecções bacterianas poderiam estar aquém das esperadas, não sendo suficientes para eliminar os microrganismos e podendo levar os indivíduos à morte. Contudo, nos históricos desses pacientes, curiosamente, não foram observados episódios recorrentes de infecção.[69]

Dessa forma, é possível notar o impacto que um polimorfismo pode exercer na resposta à terapêutica. Assim, não apenas mutações ou polimorfismos relacionados ao TLR apresentam impacto nos desfechos do tratamento do diabete, pois alguns outros correlacionados ao diabete já apresentam representatividade na literatura científica.

Na década de 2000, foram identificadas algumas variações genéticas que se associavam fortemente ao DM2, algumas delas até mesmo consideradas marcadores de predisposição. Em 2014, Hara et al.[70] identificaram, por meio de estudo de associação ampla do genoma (GWAS), mais de 70 *loci* associados ao risco do desenvolvimento de DM2.

Polimorfismos em genes associados ao diabete melito

Calpaína 10

O gene *CAPN10* está localizado na região cromossômica 2q37.3 e codifica a proteína calpaína 10, que faz parte da superfamília das calpaínas. As calpaínas são proteases cálcio-dependentes, e alterações na atividade da calpaína 10 relacionam-se fortemente com o DM2. Essa observação foi apresentada por Horikawa et al.[71] que estudaram o desenvolvimento do DM2 em populações de imigrantes mexicanos residentes nos Estados Unidos e também em pequenos grupos populacionais do norte da Europa (Finlândia) e, posteriormente, em alemães da Saxônia. Alterações haplotípicas foram traçadas, demonstrando impacto na função do gene. A herança da combinação específica de haplótipos é definida por três SNP, dentre os quais os principais são o SNP19 (por inserção/deleção), SNP43 (com troca de guanina por adenina) e SNP-63 (troca de citosina por timina). Todas essas variações ocorrem em regiões não codificantes do gene (região intrônica).[72]

O mecanismo de ação da calpaína 10 ainda é pouco elucidado nesse contexto; contudo, algumas condições surgem como hipóteses. Essa proteína é constitutivamente expressa nas células, principalmente em tecidos como músculo, fígado e ilhota pancreática e, em menor proporção, no tecido adiposo branco. Do ponto de vista fisiológico, algumas observações se tornam pertinentes no que tange ao seu papel auxiliar/regulador glicêmico. A alta expressão dessa proteína em ilhotas pancreáticas, aliada à sua regulação mediada pela concentração de cálcio, suscita seu possível papel sobre a secreção de grânulos de insulina para a circulação e, portanto, poderia melhorar a regulação glicêmica.

Essa observação foi confirmada quando cientistas inibiram a calpaína 10 nas ilhotas e a liberação de insulina pelas células beta foi reduzida. Nesse contexto, dois mecanismos foram sugeridos, em que o primeiro seria sua modulação cálcio-dependente, mas o segundo relacionava-se com a ativação do complexo SNARE, um intrincado mecanismo de junção de vesículas intracelulares com a membrana da célula. O complexo SNARE ancora as vesículas que contêm produtos a serem secretados da célula à membrana celular. A calpaína 10 parece interferir no recrutamento correto do complexo SNARE para a liberação efetiva, no caso, de grânulos de insulina para a circulação.[73]

A calpaína 10 também é encontrada no interior das mitocôndrias; no entanto, quando ativada por influxo de cálcio, dispara sinalização pró-apoptótica. Isso ocorreu experimentalmente quando ilhotas foram tratadas com ácido palmítico ou pelo estímulo hiperglicêmico em animais.[74]

Como visto, a mutação no gene *CAPN10* tem sido associada com diversos componentes que caracterizam o risco cardiometabólico, como colesterol elevado,[75] hipertrigliceridemia,[76] IMC elevado[77] e hipertensão.[78] O estudo Lipgene, do tipo coorte, demonstrou que a variação rs2953171 no gene *CAPN10* influenciou a sensibilidade à insulina por interagir com os ácidos graxos saturados, no plasma de portadores do risco cardiometabólico. Em particular, entre os indivíduos com baixas concentrações plasmáticas de ácidos graxos saturados (concentrações abaixo da média), o genótipo GG esteve associado com reduzida concentração de insulina e baixo HOMA-IR, e melhora na efetividade da glicose, quando comparados a indivíduos portadores do alelo A (GA e AA). De forma contrária, portadores do GG apresentaram elevadas concentrações de insulina em jejum e alto HOMA-IR, e baixa efetividade da glicose, em indivíduos com altas concentrações de ácidos graxos saturados circulantes (acima da média). Não houve interações entre tais alelos e ácidos graxos mono ou poli-insaturados.[79]

Receptor ativado por proliferador de peroxissomos gama (PPAR-gama)

Polimorfismos no gene que codifica o PPAR-gama, que implicam alteração da função desse receptor nuclear, apresentam relevante associação ao DM2. O PPAR-gama está envolvido na regulação da expressão de vários genes e pode ser ativado também por diversos tipos de ácidos graxos ou ligantes lipídicos. É descrito como controlador de adipogênese, lipogênese, regulação glicêmica e até mesmo como correpressor nuclear do processo inflamatório induzido por NF-kB.[80]

Além de controlar a transcrição de genes que codificam enzimas como a lipase de lipoproteína (LPL), a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), a perilipina, entre outras, o PPAR-gama também é responsável pela maturação de adipócitos ou mesmo pela alteração fenotípica de monócitos.[81]

A compreensão sobre a função exata do PPAR-gama é complexa e variável, visto que agonistas farmacológicos do PPAR, como as tiazolidinedionas, melhoram a sensibilidade à insulina, contudo apresentam como efeito indesejável o acúmulo de peso em função de seu efeito adipogênico. Por outro lado, atenuadores da resposta do PPAR-gama também parecem trazer benefícios aos sistemas metabólicos.[31] Um de seus ligantes mais estudados é o PGC-1 alfa (coativador 1-alfa do PPAR-gama), que está associado ao aumento da oxidação energética, atualmente considerado um marcador da biogênese mitocondrial, principalmente no tecido adiposo marrom.[82] Por outro lado, quando o PGC-1 alfa é modulado negativamente, reduzindo a migração do PPAR-gama ao núcleo, características como redução da glicemia e diminuição da esteatose hepática são observadas.

Com isso, pode-se compreender que o papel do PPAR-gama é finamente controlado no interior celular, e portadores de doenças metabólicas podem se beneficiar de sua regulação, assim como sua desregulação em indivíduos saudáveis pode ser a chave para o desencadeamento de doenças. Evidências de variações tanto no gene do PPAR-gama quanto do PGC-1 alfa se correlacionam ao DM2 e à obesidade. Em 2009, Ruchat et al.[83] descreveram que poderia haver interação entre os polimorfismos Pro12Ala do PPAR-gama (rs1801282) e do Gly487Ser do PGC-1 alfa (rs8192678) no desenvolvimento do DM2. Além disso, demonstrou-se que a interação não é necessária para que a predisposição ocorra, ou seja, a presença de um ou outro polimorfismo já é capaz de aumentar o risco de desenvolvimento da doença.

Outras doenças se associam aos polimorfismos descritos para o gene do PPAR-gama, como dislipidemias e o SNP rs3856806 (troca de citosina por timina na posição 1431 do gene, resultando em polimorfismo silencioso His478His no éxon 6),[84] e o SNP Pro12Ala com nefropatia diabética em caucasianos,[85] com osteopenia[86] e com câncer de mama.[87]

Embora o SNP Pro12Ala tenha grande relevância no contexto do DM2, interações entre as variações nos genes do PPAR-gama, do IRS-1, do TCF7L2 (*transcription factor 7-like 2*), do ADRB1 (*beta-1 adrenergic receptor*), da CAPN10, entre outros, têm surgido com mais frequência na literatura científica, fortalecendo as evidências de que as doenças crônicas apresentam caráter poligênico.[88,89]

TCF7L2

O TCF7L2 é um fator de transcrição que participa da via da beta-catenina, que é controlada, por sua vez, pela via da Wnt, regulando a expressão de uma série de genes. A via da Wnt regula a proliferação celular e a formação de novos tecidos por meio do controle da migração e orientação celular no desenvolvimento embrionário.[90] O TCF7L2 é expresso em diversos órgãos, como pâncreas, útero, fígado, tecido adiposo e intestino. Nas ilhotas pancreáticas, controla a expressão do gene da ISL-1 (*insulin gene enhancer protein*), que regula a produção e o processamento da pró-insulina.[85,91]

Diferente das demais variações, um SNP no gene do TCF7L2 (rs7903146 C>T, sendo T o alelo de risco) tem sido considerado o mais fortemente associado ao desenvolvimento de DM2, com frequência extremamente alta. Uma metanálise realizada em 2007 demonstrou que indivíduos que carreiam o alelo de risco apresentam risco 46 vezes maior de desenvolver DM2 em relação aos não carreadores,[92] o que torna esse SNP um dos estatisticamente mais significantes descritos até o momento para o DM2. Apesar disso, o mecanismo pelo qual o *TCF7L2* polimórfico (rs7903146) contribui com o desenvolvimento do DM2 permanece obscuro.[70,93]

De acordo com o descrito até o momento, o TCF7L2 opera em concomitância à insulina, controlando a homeostase glicêmica por meio da modulação intestinal das concentrações de GLP-1 (peptídeo semelhante ao glucagon).[92] De forma contrária, outros trabalhos demonstram que uma variação genética responsável pelo aumento da atividade do gene do TCF7L2 culmina com a redução na secreção de insulina pelas ilhotas, embora um efeito indireto na secreção de insulina pela ação do TCF7L2 em outros tecidos não possa ser descartado.[95]

A proteína glicogênio sintase quinase-3 (GSK3) participa de diversas vias, como a da insulina, mas também a da proteína Wnt. O TCF7L2 ativado pela Wnt no fígado controla a expressão de CREB e FOXO1, fatores de transcrição que participam do controle glicêmico por meio de sua atividade na produção hepática de glicose.[96,97] Portanto, apesar dos mecanismos pelos quais variações no *TCF7L2* influenciam o controle glicêmico e o risco de DM2 ainda carecerem de diversas outras descrições pontuais, alguns pontos alusivos à sua potencialidade mecanística podem ser pressupostos.[98]

IRS 1, IRS 2, PI3K e Akt

A PI3K e a Akt exercem papéis vitais para a transdução do sinal da insulina e também de diversas outras vias. São proteínas com atividade nodal, recebendo e propagando diversos estímulos. Seria possível especular que variações genéticas nos genes que codificam essas proteínas poderiam desencadear sérias complicações para a via de sinalização da insulina, culminando em resistência profunda à ação desse hormônio ou em DM2; contudo, isso não tem sido observado. As variações genéticas descritas para PI3K e Akt estão geralmente relacionadas ao aumento de sua atividade, portanto, associadas ao desenvolvimento de diversos tipos de câncer.[99] A Akt é tida como uma proteína altamente conservada entre as espécies, o que indica que variações genéticas que porventura reduzam sua atividade poderiam estar associadas ao fim da vida. Sendo assim, caso tais variações ocorram, provavelmente haverá problemas ainda durante a embriogênese, culminando com o não desenvolvimento fetal.[100]

As proteínas IRS1 e IRS2 são elementos importantes para a via da insulina. Algumas variações genéticas foram descritas, as quais normalmente reduzem suas atividades. Diferentes da PI3K e Akt, o IRS1 e IRS2 não controlam tantos eventos celulares; sendo assim, é possível que variações nessas proteínas tragam prejuízos mais pontuais à via de sinalização da insulina.

O polimorfismo Gly972Arg (rs1801278) no gene do IRS1 foi descrito em 1999,[101] e resulta em redução na atividade de IRS1, o que poderia prejudicar a secreção pancreática de insulina. Posteriormente, demonstrou-se que essa mesma variação promoveria a resistência à insulina em células musculares.[102] Em 2002, Le Fur et al.[103] identificaram, em crianças obesas e resistentes à insulina, a associação entre esse polimorfismo e o SNP Gly1057Asp (rs1805097) no IRS2. Foram avaliadas em duas coortes centenas de crianças caucasianas que apresentavam polimorfismo no *IRS1* ou *IRS2* ou, ainda, nos dois genes simultaneamente. Pacientes com polimorfismos simultâneos nos genes controladores das duas proteínas apresentaram redução de 25 a 35% na sensibilidade à insulina. Esse mesmo polimorfismo (Gly972Arg) se associa também a um pronunciado aumento nas concentrações de triacilgliceróis e AGL circulantes, com consecutiva redução na concentração de HDL e aumento da pressão arterial.[87,104]

Ainda que esses resultados estejam relacionados a maior risco de desenvolvimento do DM2, muitas investigações ainda são necessárias. A África do Sul apresenta uma das populações mais acometidas pelo DM2 no continente africano e no mundo. Em 2014, Vergotine et al.[105] investigaram nessa população a relação do DM2 com o polimorfismo Gly972Arg do IRS1. A frequência de correlação da doença com o polimorfismo foi inferior a 8%, tendo sido considerada aparentemente baixa. Dessa forma, outros fatores podem ser determinantes da doença

naquela população, e esse SNP não deve ser utilizado como marcador de prognóstico do DM2, apesar de sua alta correlação em outras populações.

KCNJ11 e *ABCC9*

Os genes *KCNJ11* e *ABCC9* são responsáveis pela codificação das proteínas Kir6.2 e Sur2A, respectivamente. Essas proteínas são subunidades componentes da estrutura dos canais de potássio sensíveis ao ATP. Esses receptores participam do metabolismo energético de forma muito intensa, monitorando finamente a disponibilidade de energia. Sendo assim, é necessário um maior detalhamento sobre o funcionamento e a interação de tais proteínas, pois variações em tais genes têm apresentado desfechos fenotípicos preponderantes para o desenvolvimento do DM2 ou para a desregulação da glicemia.

Neurônios do SNC conseguem interpretar a presença de nutrientes no organismo antes mesmo de sua chegada ao sistema nervoso. Quando a glicose é consumida e disponibilizada no intestino proximal (duodeno), ocorre a indução da liberação do hormônio incretínico GLP-1. Ele estimula a liberação pancreática de insulina, mas também sinaliza ao cérebro a presença de nutrientes, por meio de resposta neuronal aferente, reconhecida pelos receptores de potássio, induzindo resposta sacietógena.[106] Em contrarresposta, por via eferente, o SNC (hipotálamo) controla a produção hepática de glicose, mediada também pelo receptor de potássio. Assim, o hipotálamo controla a produção hepática de glicose, fornecendo mais ou diminuindo a oferta, de acordo com o estado nutricional.[35]

Em neurônios do núcleo arqueado do hipotálamo, a insulina indica disponibilidade de nutriente, pela presença de glicose no organismo. Os neurônios do núcleo ventromedial são mais sensíveis à presença de glicose e parecem manifestar uma ativação mais pronunciada em relação aos canais de potássio. Com a Akt ativada, os estímulos de produção de energia (ATP) e síntese proteica (via mTOR) são disparados. A Akt então remove o sinal inibitório sobre a mTOR que ativa os canais de dependentes de potássio e ATP.[107] Outra via envolvida na ativação dos canais dependentes de potássio é a mediada por ácidos graxos de cadeia longa, que também indicam a presença de nutrientes no organismo, por ativarem diretamente tais canais.[35]

Com os canais de potássio ativados (abertos), via potencial de ação, uma sinalização eferente indica a suspensão da produção hepática de glicose. Não se sabe como a mTOR sensibiliza exatamente os canais de potássio; entretanto, a ativação parece ser decorrente da interação com as subunidades formadoras do canal de potássio. O canal é formado por uma proteína octamérica, em que quatro proteínas chamadas de Kir 6.2 formam os poros de liberação do potássio, e outras quatro subunidades chamadas de Sur-1 compreendem a região reguladora.[108] As proteínas Sur-1 são subunidades receptoras de sulfonilureia. Também é desconhecido como ocorre a interação entre as subunidades Sur-1 e Kir 6.2. Contudo, evidências demonstram que o ATP/ADP se liga na subunidade Kir 6.2 e a inibe (fechando o poro). De forma contrária, o fosfatidilinositol 2 fosfato (PIP-2) ou os ácidos graxos de cadeia longa estimulam as subunidades Kir 6.2 (abrindo o poro), justamente por competirem localmente com as moléculas de ATP.[109] Estudos demonstram ainda que indivíduos carreadores de variações genéticas no resíduo lisina 23 da Kir 6.2 podem apresentar predisposição aumentada para DM2, por perda da capacidade regulatória dos canais de potássio. A Kir 6.2 apresenta quatro sítios de ligação para o ATP e, possivelmente, a variação genética no resíduo lisina 23 pode desequilibrar o sistema.[110]

Os canais de potássio estão presentes também nas ilhotas pancreáticas e controlam a liberação de insulina. Variações genéticas descritas para o receptor na ilhota resultam em aumento da atividade do receptor, que eleva consecutivamente a liberação de insulina e, em consequência, a produção do hormônio. A atividade incrementada da ilhota de forma crônica conduz a célula beta à falência, sendo esta mais uma forma pela qual variações genéticas nesse receptor contribuem para o desenvolvimento do DM2.[111]

Uma das variações mais importantes que ocorrem no gene *KCNJ11* é o SNP Lys23Glu (rs5219 – troca de guanina por adenina na posição 67). Esse polimorfismo foi descrito pela primeira vez em 1998 em um estudo de Hani et al.[112] com famílias francesas. Atualmente, existem numerosos estudos investigando diversas populações no mundo, sendo talvez um dos principais polimorfismos associados ao DM2.

Fator nuclear hepático

O fator nuclear hepático (HNF) é o gene que controla uma proteína de mesmo nome, envolvida preponderantemente com a produção hepática de glicose. Esse fator tem sua transcrição induzida pela FoxO1 associada à PGC-1alfa. Uma vez produzido, o HNF-4alfa também atua como fator de transcrição e controla a produção de PEPCK e glicose-6-fosfatase, proteínas essenciais na gliconeogênese.[31] Portanto, variações no gene do HNF podem ter implicações importantes no DM2, pois além do controle hepático de glicose, esse fator também medeia a produção de insulina em ilhotas pancreáticas.

Existem vários SNP descritos para o HNF-4 alfa. Entre os principais relacionados ao DM2 estão a troca de adenina por citosina na região promotora do gene

(-728A/C); o IVS1-5T, com troca de citosina por timina na região do íntron 1; a troca de citosina por timina na posição 12352 do éxon 4, que culmina na substituição de uma treonina por uma isoleucina no códon 139 (Thr139Ile); a troca de guanina por adenina na posição 12355 no éxon 4, resultando em troca de arginina por glutamina no códon 140 (Arg140Gln); e a troca de guanina por adenina, na posição 22688 no éxon 8, culminando com substituição de arginina por histidina no códon 312 (Arg312His).[113]

Em 1996, Yamagata et al.[114] demonstraram a existência de diversas variações no gene do HNF-4 alfa, que se correlacionavam com um tipo de diabete chamado Mody (*maturity-onset diabetes of the young*), ou seja, um subtipo de DM caracterizado por manifestação precoce (em geral antes dos 25 anos de idade) e com transmissão autossômica dominante (determinada em pelo menos três gerações). O Mody corresponde a um defeito primário na secreção da insulina, associado à disfunção nas células beta pancreáticas. Nesse sentido, em particular, uma mutação representada pela troca de citosina por guanina na região promotora do gene do HNF4a (posição -192) tem sido avaliada. Dinamarqueses e noruegueses com diabete tipo Mody, carreadores do alelo G, apresentaram secreção de insulina prejudicada quando estimulados com glicose, bem como redução de 18% nas concentrações de colesterol total, o que sugere, por sua vez, redução na expressão de HNF-4A no fígado.[115,116]

Glicoquinase

O gene da glicoquinase (*GCK*) também é um alvo relacionado ao diabete tipo Mody. A proteína GCK atua como um sensor de glicose, que controla a liberação de insulina pela ilhota pancreática. Variações no gene da GCK estão relacionadas à hiperliberação de insulina, conduzindo as células beta pancreáticas rapidamente à morte. O SNP Arg447Pro caracteriza uma das mais importantes variações genéticas relacionadas ao DM2.[117]

O SNP Arg447Pro tem sido observado em crianças com casos de hiperinsulinemia persistente, com consequente hipoglicemia e liberação de insulina mesmo em baixas concentrações de glicose. A falha na secreção de insulina surge como descrito anteriormente, conduzindo o indivíduo ao DM2 juvenil. Shammas et al.[117] descreveram os SNP Arg447Pro e Gly440Stop como redutores da atividade da GCK. A troca de arginina por prolina no códon 447 altera a conformação estrutural da enzima, desestabilizando-a e culminando na perda de sua função. Também, a troca de glicina por um códon de terminação na posição 440 da proteína conduz à inativação da porção catalítica da enzima.

Interleucina 6

A IL-6 é alvo de investigações interessantes, em função da ambiguidade de suas respostas orgânicas. Com atividade pleiotrópica extensa, tem sido mais estudada com relação a sua atividade pró-inflamatória; contudo, exerce importantes ações hematopoiéticas, na regulação do sistema imune e também nas respostas de fase aguda.[118] Compreende-se melhor suas ações quando se avalia seu papel tecido-específico.

Cabe destacar que a IL-6 apresenta atividade anti-inflamatória quando se liga ao seu receptor (IL-6R) na membrana de células capazes de expressá-lo (hepatócitos e determinadas subpopulações de leucócitos), mas sua função pró-inflamatória, de ativação da via Janus quinase/transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (Jas/STAT3), a qual é evidenciada em doenças inflamatórias crônicas, é decorrente da chamada trans-sinalização, que consiste na ligação da IL-6 à versão solúvel de seu receptor no plasma. Esse complexo IL-6-IL-6R, então, associa-se à glicoproteína (GP) 130 transmembrana, presente em todos os tipos celulares, o que promove a ativação da via Jas/STAT3.[119]

Já há mais de uma década, polimorfismos relacionados à IL-6 têm sido associados à piora na resposta da regulação glicêmica. Algumas variações no gene dessa proteína estão relacionadas ao aumento da sua atividade, tendo, nesses casos, papel pró-inflamatório com ação exacerbada. As concentrações de IL-6 estão geralmente aumentadas na circulação de pacientes sob risco cardiometabólico, mas também naqueles com apenas o fenótipo da resistência à insulina. Embora as concentrações de outros componentes de fase aguda sejam aumentadas concomitantemente, nem todos eles aumentam em todos os pacientes de maneira uniforme. Isso sugere que os componentes da resposta imune ou de fase aguda sejam regulados de forma individual.[120]

O polimorfismo -174G>C (rs1800795) altera o padrão de transcrição do gene da IL-6, aumentando a produção da proteína. Esse SNP também tem sido correlacionado com a obesidade, especialmente em indivíduos com adiposidade central elevada.[120]

Rudofsky et al.[121] não observaram correlação desse polimorfismo com complicações microvasculares em 235 pacientes com DM1 e 498 com DM2, com relação a nefropatias e neuropatias. De todos os pacientes, 43% apresentaram o genótipo heterozigoto (o mais frequente na maioria dos estudos), 41% eram homozigotos selvagens e 15,6%, homozigotos para a variante. Correlação positiva com retinopatia diabética foi observada nos pacientes carreadores de dois alelos variantes (CC).

Outro estudo interessante mostrou que genótipo heterozigoto esteve fortemente associado com problemas pe-

riodontais em pacientes com DM2. As periodontites são desfechos comuns em diabéticos e, entre os pacientes com as placas bacterianas dentais mais visíveis e com sangramentos gengivais, a maioria apresentava o genótipo heterozigoto. Concomitantemente, esses pacientes apresentaram hemoglobina glicada (HbA1c) elevada, e houve correlação forte para a incidência de HbA1c elevada e suscetibilidade para doenças periodontais.[122]

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A fisiopatologia molecular do DM2 é complexa e está intimamente relacionada à obesidade. Indivíduos obesos não necessariamente desenvolverão DM2, mas é a obesidade a condição clínica correlata mais evidente. Portanto, mesmo indivíduos magros podem desenvolver o DM2, mas os mecanismos moleculares são semelhantes. Outros mecanismos ainda precisam ser descritos para tornar mais robusta a compreensão sobre as formas pelas quais ocorre a ativação ou inativação de vias de captação de glicose, inflamação, estresse do retículo endoplasmático, controle de morte celular, atividade de proteínas fosfatases, variações genéticas, entre outras.

As variações genéticas não explicam todas as questões, mas contribuem de forma significativa para a compreensão das razões da instalação da doença mesmo em indivíduos com estilo de vida considerado protetor. De qualquer forma, ainda há muito a ser estudado, pois diversas variações genéticas já foram descobertas, mas é necessário compreender as interações entre elas, bem como as vias de sinalização por elas afetadas e a influência da alimentação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Malik VS, Willett WC, Hu FB. Global obesity: trends, risk factors and policy implications. Nature Reviews. Endocrinology. 2013;9(1):13-27.
2. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. Nature. 2006;444(7121): 840-46.
3. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. Annual Review of Immunology. 2011;29.
4. Zhang X et al. Hypothalamic IKKβ/NF-κB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. Cell. 2008;135:61-73.
5. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature. 2001;414(6865).
6. Blüher M. Adipose tissue dysfunction contributes to obesity related metabolic diseases. Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism. 2013;27(2):163-77.
7. Spiegelman BM, Flier JS. Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. Cell. 1996;87(3):377-89.
8. Brüning JC et al. A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. Molecular cell. 1998;2(5):559-69.
9. Kim JK et al. Glucose toxicity and the development of diabetes in mice with muscle-specific inactivation of glut4. Journal of Clinical Investigation. 2001;108(1):153-60.
10. Hawley JA, Lessard SJ. Exercise training-induced improvements in insulin action. In: Acta Physiologica. 2008;192(1):127-35.
11. Le Roith D et al. Inactivation of muscle insulin and IGF-I receptors and insulin responsiveness. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care. 2002;5:371-75.
12. De Meyts P et al. Structural biology of insulin and IGF-1 receptors. Novartis Foundation Symposium. 2004;262:160-71.
13. DeFronzo RA, Tripathy D. Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. Diabetes Care. 2009;32(Suppl 2):S157-S163.
14. Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for insulin resistance: Common threads and missing links. Cell. 2012;148(5):852-71.
15. Berryman DE et al. The GH/IGF-1 axis in obesity: pathophysiology and therapeutic considerations. Nature reviews. Endocrinology. 2013;9(6):346-56.
16. Bandyopadhyay GK et al. Increased malonyl-CoA levels in muscle from obese and type 2 diabetic subjects lead to decreased fatty acid oxidation and increased lipogenesis; thiazolidinedione treatment reverses these defects. Diabetes. 2006;55(8):2277-85.
17. Park D et al. Exercise ameliorates insulin resistance via Ca 2 + signals distinct from those of insulin for GLUT4 translocation in skeletal muscles. Diabetes. 2014.
18. Vicent D et al. The role of endothelial insulin signaling in the regulation of vascular tone and insulin resistance. J Clin Invest. 2003;111:1373-80.
19. Prada PO et al. Selective modulation of the CAP/Cbl pathway in the adipose tissue of high fat diet treated rats. Febs Letters. 2006(580):4889-94.
20. Blüher M et al. Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance. Developmental Cell. 2002;3:25-38.
21. Stenbit AE et al. GLUT4 heterozygous knockout mice develop muscle insulin resistance and diabetes. Nature Publishing Group. 1997;3:1096-101.
22. Carvalho E et al. Adipose-specific overexpression of GLUT4 reverses insulin resistance and diabetes in mice lacking GLUT4 selectively in muscle. American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism. 2005;289:E551-E561.
23. Lelliott C, Vidal-Puig AJ. Lipotoxicity, an imbalance between lipogenesis de novo and fatty acid oxidation. International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity. 2004;28(Suppl 4):S22-S28.
24. Adkins A et al. Higher insulin concentrations are required to suppress gluconeogenesis than glycogenolysis in nondiabetic humans. Diabetes. 2003;52(9):2213-20.
25. Michael MD et al. Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. Molecular Cell. 2000;6:87-97.
26. Cintra DE et al. Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. Journal of Hepatology. 2008;48:628-37.
27. Puigserver P et al. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1 – PGC-1 a interaction. Nature. 2003;423:550-55.
28. Marinho R et al. Endurance exercise training increases APPL1 expression and improves insulin signaling in the hepatic tissue of diet-induced obese mice, independently of weight loss. Journal of Cellular Physiology. 2012(227):2917-26.
29. De Souza CT et al. Acute exercise reduces hepatic glucose production through inhibition of the Foxo1/HNF-4alpha pathway in insulin resistant mice. The Journal of Physiology. 2010;588(2010):2239-53.

30. Ropelle ER et al. Acute exercise modulates the Foxo1/PGC-1alpha pathway in the liver of diet-induced obesity rats. The Journal of Physiology. 2009;587:2069-76.
31. Souza CT et al. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypotha-lamus. Endocrinology. 2005;146(10):4192-99.
32. Prada PO et al. Western diet modulates insulin signaling, c-jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. Endocrinology. 2005;146(3).
33. Thaler JP, Yi CX, Schur EA, Guyenet SJ, Hwang BH, Dietrich MO et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. J Clin Invest. 2012;122(1):153-62.
34. Bruning JC. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. Science. 2000;289:2122-25.
35. Obici S et al. Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. Nature Medicine. 2002;8(12): 1376-82.
36. Johnson AMF, Olefsky JM. The origins and drivers of insulin resistance. Cell. 2013;152(4):673-84.
37. Zhu Y et al. Inflammation and the depot-specific secretome of human preadipocytes. Obesity. 2015;23(5):989-99.
38. Hotamisligil GS, Shargill N, Spiegelman B. Adipose expression of tumor necrosis factor α: direct role in obesity-linked insulin resistance. Science. 1993;259(5091):87-91.
39. Hotamisligil GS, Erbay E. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. Nature Reviews. Immunology. 2008;8:923-34.
40. Bays HE. Adiposopathy: is "sick fat" a cardiovascular disease? Journal of the American College of Cardiology. 2011;57(25): 2461-73.
41. Hotamisligil GS. Inflammation and endoplasmic reticulum stress in obesity and diabetes. International Journal of Obesity. 2008;32(Suppl 7):S52–S54.
42. Boden G. Effects of free fatty acids on gluconeogenesis and glycogenolysis. Life Sci. 2003;72(9):977-88.
43. Collins QF et al. p38 Mitogen-activated protein kinase mediates free fatty acid-induced gluconeogenesis in hepatocytes. The Journal of Biological Chemistry. 2006;281(34):24336-44.
44. Guo S. Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. The Journal of Endocrinology. 2014;220:T1-T23.
45. Yin MJ, Yamamoto Y, Gaynor RB. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. Nature. 1998;396:77-80.
46. Han MS et al. JNK expression by macrophages promotes obesity-induced insulin resistance and inflammation. Science. 2013;339:218-22.
47. Tilg H, Moschen AR. Insulin resistance, inflammation, and non-alcoholic fatty liver disease. Trends in Endocrinology and Metabolism. 2008;19(10):371-79.
48. Chiarreotto-Ropelle EC et al. Acute exercise suppresses hypothalamic PTP1B protein level and improves insulin and leptin signaling in obese rats. American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism. 2013;305(5):E649-E659.
49. Benito M. Tissue specificity on insulin action and resistance: past to recent mechanisms. Acta Physiologica. 2011;201:297-312.
50. Du K et al. TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. Science. 2003(300):1574-77.
51. Matos A et al. Acute exercise reverses TRB3 expression in the skeletal muscle and ameliorates whole body insulin sensitivity in diabetic mice. Acta Physiologica. 2010;198:61-69.
52. Cnop M, Foufelle F, Velloso L. Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. Trends in Molecular Medicine. 2012;18(1): 59-68.
53. Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. Cell. 2010;140:900-17.
54. Ropelle ER et al. IL-6 and IL-10 anti-inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKKβ and ER stress inhibition. PLoS Biology. 2010;8(8):e1000465.
55. Ozcan L et al. Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. Cell Metabolism. 2009;9(1): 35-51.
56. Shimabukuro M et al. Role of nitric oxide in obesity-induced beta cell disease. The Journal of Clinical Investigation. 1997;100(2): 290-95.
57. Carvalho-Filho M et al. Targeted disruption of iNOS prevents LPS-induced S-nitrosation of IRbeta/IRS-1 and Akt and insulin resis-tance in muscle of mice. American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism. 2006;291:E476-E482.
58. Pauli JR, Ropelle ER, Cintra DE, Carvalho-Filho MA et al. Acute physical exercise reverses S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1 and protein kinase B/Akt in diet-induced obese Wistar rats. The Journal of Physiology. 2008;586.
59. Bédard S, Marcotte B, Marette A. Cytokines modulate glucose transport in skeletal muscle by inducing the expression of inducible nitric oxide synthase. The Biochemical Journal. 1997;325(Pt 2):487-93.
60. White MF. The insulin signalling systemand the IRS proteins. Insulin. 1997;2:2-17.
61. Semenkovich CF. Review series: Insulin resistance and atherosclerosis. J Clin Invest. 2006;116(7):1813-22.
62. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. J Clin Invest. 2005;115(5):1111-19.
63. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. Nature. 2006;444(7121):860-7.
64. Shi H et al. TLR4 links innate immunity and fatty acid – induced insulin resistance. The Journal of Clinical Investigation. 2006;116(11):3015-25.
65. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Review series Inflammation and insulin resistance. The Journal of Clinical Investigation. 2006;116(7):1793-801.
66. Beutler B. Innate immunity: an overview. Molecular Immunology. 2004;40(12):845-59.
67. Tsukumo DML et al. Loss-of-function mutation in toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. Diabetes. 2007;56(8):1986-98.
68. Calisto KL et al. Atorvastatin improves survival in septic rats: effect on tissue inflammatory pathway and on insulin signaling. PLoS One. 2010;5(12):1-12.
69. Bagarolli RA, Saad MJ, Saad ST. Toll-like receptor 4 and inducible nitric oxide synthase gene polymorphisms are associated with Type 2 diabetes. J Diabetes Complications. 2010;24(3):192-8.
70. Hara K et al. Genome-wide association study identifies three novel loci for type 2 diabetes. Human Molecular Genetics. 2014;23(1):239-46.
71. Horikawa Y. Calpain 10 as a susceptibility gene of type 2 diabetes. Nihon Rinsho. 2002;60(Suppl 7):489-97.
72. Pandurangan M, Hwang I, Orhirbat C, Jieun Y, Cho SH. The calpain system and diabetes. Pathophysiology. 2014;21(2):161-7.
73. Pánico P, Salazar AM, Burns AL, Ostrosky-Wegman P. Role of calpain-10 in the development of diabetes mellitus and its complications. Arch Med Res. 2014;45(2):103-15.

74. Johnson JD, Han Z, Otani K, Ye H, Zhang Y, Wu H, Horikawa Y, Misler S, Bell GI, Polonsky KS. RyR2 and calpain-10 delineate a novel apoptosis pathway in pancreatic islets. J Biol Chem. 2004;279(23):24794-802.

75. Wu B, Takahashi J, Fu M, Cheng H, Matsumura S, Taniguchi H. Variants of calpain-10 gene and its association with type 2 diabetes mellitus in a Chinese population. Diabetes Res Clin Pract. 2005;68(2):155-61.

76. Carlsson E, Fredriksson J, Groop L, Ridderstråle M. Variation in the calpain-10 gene is associated with elevated triglyceride levels and reduced adipose tissue messenger ribonucleic acid expression in obese Swedish subjects. J Clin Endocrinol Metab. 2004;89(7):3601-5.

77. Shima Y, Nakanishi K, Odawara M, Kobayashi T, Ohta H. Association of the SNP-19 genotype 22 in the calpain-10 gene with elevated body mass index and hemoglobin A1c levels in Japanese. Clin Chim Acta. 2003;336(1-2):89-96.

78. Garant MJ, Kao WH, Brancati F, Coresh J, Rami TM, Hanis CL et al. SNP43 of CAPN10 and the risk of type 2 diabetes in African-Americans: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. Atherosclerosis Risk in Communities Study. Diabetes. 2002;51(1):231-37.

79. Perez-Martinez P, Delgado-Lista J, Garcia-Rios A, Ferguson JF, Gulseth HL, Williams CM et al. Calpain-10 interacts with plasma saturated fatty acid concentrations to influence insulin resistance in individuals with the metabolic syndrome. Am J Clin Nutr. 2011;93(5):1136-41.

80. Tontonoz P, Spiegelman BM. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. Annual Review of Biochemistry. 2008(77):289-312.

81. Nakamura MT, Yudell BE, Loor JJ. Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. Prog Lipid Res. 2014;53:124-44.

82. Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC et al. A PGC1-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. Nature. 2012;481(7382):463-8.

83. Ruchat SM, Weisnagel SJ, Vohl MC, Rankinen T, Bouchard C, Pérusse L. Evidence for interaction between PPARG Pro12Ala and PPARGC1A Gly482Ser polymorphisms in determining type 2 diabetes intermediate phenotypes in overweight subjects. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2009;117(9):455-9.

84. Oladi M, Nohtani M, Avan A, Mirhafez SR, Tajbakhsh A, Ghasemi F et al. Impact of the C1431T polymorphism of the peroxisome proliferator activated receptor-gamma (PPAR-gamma) gene on fasted serum lipid levels in patients with coronary artery disease. Ann Nutr Metab. 2015;66(2-3):149-54.

85. Zhou Y et al. TCF7L2 is a master regulator of insulin production and processing. Human Molecular Genetics. 2014;23(24):1-34.

86. Sahmani M, Gholami A, Azarkeivan A, Darabi M, Ahmadi MH, Sabet MS, Najafipour R. Peroxisome proliferator-activated receptor-γ Pro12Ala polymorphism and risk of osteopenia in β-thalassemia major patients. Hemoglobin. 2013;37(6):564-73.

87. Mao Q, Guo H, Gao L, Wang H, Ma X. Peroxisome proliferator-activated receptor γ2 Pro12Ala (rs1801282) polymorphism and breast cancer susceptibility: a meta-analysis. Mol Med Rep. 2013;8(6):1773-8.

88. Estrada-Velasco BI, Cruz M, Madrid-Marina V, Martínez-Nava GA, Gomez-Zamudio J, Burguete-García AI. IRS1, TCF7L2, ADRB1, PPARG, and HHEX polymorphisms associated with atherogenic risk in Mexican population. Biomed Res Int. 2013;2013:394523.

89. Martínez-Gómez LE, Cruz M, Martínez-Nava GA, Madrid-Marina V, Parra E, García-Mena J et al. A replication study of the IRS1, CAPN10, TCF7L2, and PPARG gene polymorphisms associated with type 2 diabetes in two different populations of Mexico. Ann Hum Genet. 2011;75(5):612-20.

90. Sudchada P, Scarpace K. Transcription factor 7-like 2 polymorphisms and diabetic retinopathy: a systematic review. Genet Mol Res. 2014;13(3):5865-72.

91. Lyssenko V et al. Mechanisms by which common variants in the TCF7L2 gene increase risk of type 2 diabetes. J Clin Invest. 2007;117(8):2155-63.

92. Cauchi S, Meyre D, Choquet H, Deghmoun S, Durand E, Gaget S, Lecoeur C, Froguel P, Levy-Marchal C. TCF7L2 rs7903146 variant does not associate with smallness for gestational age in the French population. BMC Med Genet. 2007;8:37.

93. Sladek R et al. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. Nature. 2007;445(7130):881-85.

94. Grant SF, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Manolescu A, Sainz J et al. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. Nat Genet. 2006;38(3):320-3.

95. Florez JC. The new type 2 diabetes gene TCF7L2. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2007;10(4):391-6.

96. Boj SF, van Es JH, Huch M, Li VS, José A, Hatzis P et al. Diabetes risk gene and Wnt effector Tcf7l2/TCF4 controls hepatic response to perinatal and adult metabolic demand. Cell. 2012;151(7):1595-607.

97. Oh KJ, Park J, Kim SS, Oh H, Choi CS, Koo SH. TCF7L2 modulates glucose homeostasis by regulating CREB- and FoxO1-dependent transcriptional pathway in the liver. PLoS Genet. 2012;8(9):e1002986.

98. Roswall N et al. Association between Mediterranean and Nordic diet scores and changes in weight and waist circumference: influence of FTO and TCF7L2 loci. Am J Clin Nutr. 2014;100(4):1188-97.

99. Chakraborty C, Doss CG, Bhatia R, Agoramoorthy G. Profiling of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) proteins in insulin signaling pathway. Appl Biochem Biotechnol. 2015;175(7):3431-46.

100. Baran V, Fabian D, Rehak P. Akt/PKB plays role of apoptosis relay on entry into first mitosis of mouse embryo. Zygote. 2013;21(4):406-16.

101. Porzio O, Federici M, Hribal ML, Lauro D, Accili D, Lauro R, Borboni P, Sesti G. The Gly972-->Arg amino acid polymorphism in IRS-1 impairs insulin secretion in pancreatic beta cells. J Clin Invest. 1999;104(3):357-64.

102. Hribal ML, Federici M, Porzio O, Lauro D, Borboni P, Accili D, Lauro R, Sesti G. The Gly-->Arg972 amino acid polymorphism in insulin receptor substrate-1 affects glucose metabolism in skeletal muscle cells. J Clin Endocrinol Metab. 2000;85(5):2004-13.

103. Le Fur S, Le Stunff C, Bougnères P. Increased insulin resistance in obese children who have both 972 IRS-1 and 1057 IRS-2 polymorphisms. Diabetes. 2002;51(Suppl 3):S304-7.

104. Marini MA, Frontoni S, Mineo D, Bracaglia D, Cardellini M, De Nicolais P, Baroni A, D'Alfonso R, Perna M, Lauro D, Federici M, Gambardella S, Lauro R, Sesti G. The Arg972 variant in insulin receptor substrate-1 is associated with an atherogenic profile in offspring of type 2 diabetic patients. J Clin Endocrinol Metab. 2003;88(7):3368-71.

105. Vergotine Z, Kengne AP, Erasmus RT, Matsha TE. No evidence for association of insulin receptor substrate-1 Gly972Arg variant with type 2 diabetes mellitus in a mixed-ancestry population of South Africa. S Afr Med J. 2014;104(6):420-3.

106. Tudurí E, Beiroa D, Porteiro B, López M, Diéguez C, Nogueiras R. Acute but not chronic activation of brain glucagon-like peptide-1 receptors enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice. Diabetes Obes Metab. 2015;17(8):789-99.
107. Kwon G, Marshall CA, Pappan KL, Remedi MS, McDaniel ML. Signaling elements involved in the metabolic regulation of mTOR by nutrients, incretins, and growth factors in islets. Diabetes. 2004;53(Suppl 3):S225-32
108. Fang J, Meng Q, Vogt PK, Zhang R, Jiang BH. A downstream kinase of the mammalian target of rapamycin, p70S6K1, regulates human double minute 2 protein phosphorylation and stability. J Cell Physiol. 2006;209(2):261-5.
109. Ashcroft FM. K(ATP) channels and insulin secretion: a key role in health and disease. Biochem Soc Trans. 2006;34(Pt 2):243-6.
110. Mikhailov MV, Campbell JD, de Wet H, Shimomura K, Zadek B, Collins RF, Sansom MS, Ford RC, Ashcroft FM. 3-D structural and functional characterization of the purified KATP channel complex Kir6.2-SUR1. Embo J. 2005;24(23):4166-75.
111. Bonfanti DH, Alcazar LP, Arakaki PA, Martins LT, Agustini BC, de Moraes Rego FG, Frigeri HR. ATP-dependent potassium channels and type 2 diabetes mellitus. Clin Biochem. 2015;48(7,8):476-82.
112. Hani EH, Boutin P, Durand E, Inoue H, Permutt MA, Velho G et al. Missense mutations in the pancreatic islet beta cell inwardly rectifying K+ channel gene (KIR6.2/BIR): a meta-analysis suggests a role in the polygenic basis of Type II diabetes mellitus in Caucasians. Diabetologia. 1998;41(12):1511-15.
113. Plengvidhya N, Boonyasrisawat W, Chongjaroen N, Jungtrakoon P, Sriussadaporn S, Vannaseang S, Banchuin N, Yenchitsomanus PT. Mutations of maturity-onset diabetes of the young (Mody) genes in Thais with early-onset type 2 diabetes mellitus. Clin Endocrinol (Oxf). 2009;70(6):847-53.
114. Yamagata K, Furuta H, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Cox NJ et al. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). Nature. 1996;384(6608):458-60.
115. Ek J, Hansen SP, Lajer M, Nicot C, Boesgaard TW, Pruhova S et al. A novel -192c/g mutation in the proximal P2 promoter of the hepatocyte nuclear factor-4 alpha gene (HNF4A) associates with late-onset diabetes. Diabetes. 2006;55(6):1869-73.
116. Raeder H, Bjørkhaug L, Johansson S, Mangseth K, Sagen JV, Hunting A et al. A hepatocyte nuclear factor-4 alpha gene (HNF4A) P2 promoter haplotype linked with late-onset diabetes: studies of HNF4A variants in the Norwegian MODY registry. Diabetes. 2006;55(6):1899-903.
117. Shammas C, Neocleous V, Phelan MM, Lian LY, Skordis N, Phylactou LA. A report of 2 new cases of MODY2 and review of the literature: implications in the search for type 2 diabetes drugs. Metabolism. 2013;62(11):1535-42.
118. Fernández-Real JM, Ricart W. An increased proinflammatory activity is inherent in insulin resistance. Med Clin (Barc). 2000;115(5):185-9.
119. Garbers C, Aparicio-Siegmund S, Rose-John S. The IL-6/gp130/STAT3 signaling axis: recent advances towards specific inhibition. Curr Opin Immunol. 2015;34:75-82.
120. Gabay C, Porter B, Guenette D, Billir B, Arend WP. Interleukin-4 (IL-4) and IL-13 enhance the effect of IL-1beta on production of IL-1 receptor antagonist by human primary hepatocytes and hepatoma HepG2 cells: differential effect on C-reactive protein production. Blood. 1999;93(4):1299-307.
121. Rudofsky G Jr, Schlotterer A, Reismann P, Engel J, Grafe IA, Tafel J, Morcos M, Humpert PM, Nawroth P, Bierhaus A, Hamann A. The -174G>C IL-6 gene promoter polymorphism and diabetic microvascular complications. Horm Metab Res. 2009;41(4):308-13.
122. Raunio T, Knuuttila M, Hiltunen L, Karttunen R, Vainio O, Tervonen T. IL-6(-174) genotype associated with the extent of periodontal disease in type 1 diabetic subjects. J Clin Periodontol. 2009;36(1):11-7.

23 Doenças cardiovasculares: enfoque nas dislipidemias

Lana Pacheco Franco
Carla Cristina de Morais
Marcelo Macedo Rogero
Maria Aderuza Horst
Cristiane Cominetti

EPIDEMIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA

Nas últimas décadas, mudanças sociais e econômicas têm refletido no estilo de vida da população mundial, resultando no aumento do sedentarismo e na promoção de modificações marcantes nos hábitos alimentares. Tais alterações favorecem o aumento da prevalência das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), as quais respondem por 60% das mortes em âmbito mundial.[1] Entre as DCNT, as doenças cardiovasculares (DCV) constituem a maior causa de mortes no mundo. Em 2008, foram responsáveis por mais de 17 milhões de óbitos, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS). No Brasil, 30,1% das mortes, em 2010, decorreram das DCV.[2] Esses números são crescentes em países em desenvolvimento e apresentam-se em declínio nos países desenvolvidos.[1]

O processo de desenvolvimento das DCV resulta da interação entre fatores de risco modificáveis e não modificáveis. Entre os fatores de risco não modificáveis destacam-se a idade, o sexo e as características genéticas (genótipo). Já os fatores modificáveis incluem, principalmente, o sedentarismo, os hábitos alimentares, o tabagismo e as dislipidemias.[3]

As dislipidemias caracterizam-se por alterações nas concentrações séricas de colesterol, o que está associado a diferentes lipoproteínas, e nas concentrações de triacilgliceróis (TG). As dislipidemias podem ocorrer em razão de características genotípicas do indivíduo ou em função do estilo de vida (tabagismo, sedentarismo etc.) e de hábitos alimentares (ingestão excessiva de alimentos ricos em colesterol, carboidratos simples, ácidos graxos trans e saturados ou ingestão calórica total aumentada).[3]

As dislipidemias representam um fator de risco para o desenvolvimento da aterosclerose, considerada o ponto inicial na fisiopatologia das DCV. A aterosclerose é uma condição inflamatória crônica de origem multifatorial que acomete, sobretudo, a camada íntima das artérias de médio e grande calibres. Caracteriza-se, basicamente, pela disfunção endotelial (causada por dislipidemias, estresse oxidativo, tabagismo, hipertensão arterial, diabete etc.), seguida da ativação do sistema imune e da formação da placa aterosclerótica no endotélio vascular. Essa placa, quando instável, pode ocasionar a formação de trombos, culminando em manifestações clínicas das DCV, como infarto agudo do miocárdio e acidente vascular encefálico (AVE).[3-5]

As concentrações séricas elevadas de TG, de lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) e de colesterol total, assim como concentrações reduzidas de lipoproteínas de alta densidade (HDL-c), associam-se ao maior risco para DCV. Alterações nas concentrações de lipoproteínas e de lipídios sanguíneos colaboram para a aterogênese por meio de mecanismos complexos envolvidos na modificação do endotélio vascular, nas alterações plaquetárias, na resposta inflamatória e na formação de células espumosas.[6]

Em relação à LDL, o tamanho dessas partículas é um fator extremamente relevante na determinação do risco cardiovascular.[7] A LDL apresenta potencial aterogênico à medida que se torna pequena e mais densa. Apresentando essas características, as partículas adentram o espaço subendotelial da parede vascular com maior facilidade, além de tornarem-se mais vulneráveis à oxidação. Essa oxidação ocorre quando há metais e espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN), formando, em última instância, a LDL oxidada (LDL-ox).[8] A LDL-ox é capaz de induzir a expressão de moléculas de adesão no endotélio, atraindo leucócitos (monócitos e linfócitos) para o espaço subendotelial. Os monócitos diferen-

ciam-se em macrófagos, que expressam os receptores do tipo *scavenger* (ScR). Esses receptores ligam-se à LDL-ox e possibilitam sua endocitose, promovendo a formação de células espumosas (*foam cells*), a partir das quais são formadas as estrias de colesterol, primeira etapa da aterosclerose.[5,8] A Figura 23.1 ilustra esse processo de maneira simplificada.

Com a lesão inicial, o processo inflamatório crônico segue com redução da concentração de substâncias vasodilatadoras e antitrombóticas e aumento daquelas com ação vasoconstritora e pró-trombótica, o que caracteriza a disfunção endotelial com alterações no tônus vascular. Além disso, há modificação no padrão de crescimento de células musculares lisas, maior adesão de monócitos, alteração na função plaquetária e na atividade fibrinolítica.[10,11]

Além da LDL, o aumento das concentrações de TG também se relaciona com o desenvolvimento de DCV. Sugere-se que os TG sejam capazes de associar-se a moléculas de LDL-ox. Além disso, as lipoproteínas ricas em TG e seus remanescentes podem favorecer os processos inflamatórios, a expressão de moléculas de adesão leucocitária e de fatores de coagulação, bem como promover o aumento do estresse oxidativo.[12]

Em contrapartida à LDL e aos TG, a HDL mantém relação inversa com a aterosclerose. O aumento das concentrações séricas de HDL-c contribui para a redução da inflamação por promover diminuição da expressão das moléculas de adesão endoteliais, proteção contra a oxidação das LDL e por contribuir para o transporte reverso do colesterol.[13]

Conforme mencionado, os mecanismos fisiológicos e os fatores ambientais envolvidos na progressão da aterosclerose interagem com fatores genéticos, resultando no aumento do risco cardiovascular.[14,15] Assim, alguns

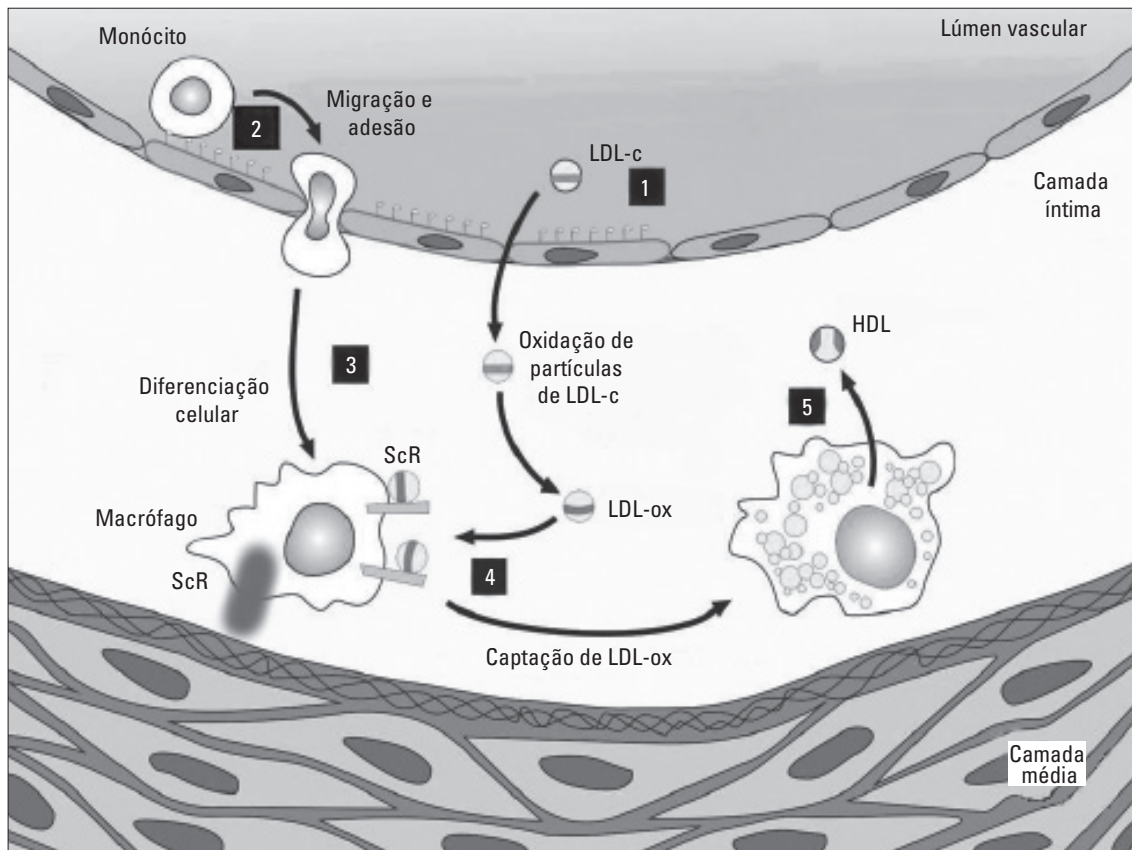



Figura 23.1 Esquema simplificado da fase inicial da aterosclerose. (1) O dano ao endotélio vascular facilita a entrada de partículas de LDL-c pequenas e densas. Ocorre, assim, a oxidação dessas partículas no espaço subendotelial na presença de metais livres, ERO (espécies reativas de oxigênio) e ERN (espécies reativas de nitrogênio). (2) Em seguida, essas partículas sofrem oxidação no endotélio vascular, o que, por sua vez, atrai monócitos e linfócitos T por ação da proteína quimioatrativa de monócitos (MCP-1), da interleucina 1 (IL-1) e do fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), que adentram a camada íntima. (3) Diferenciação dos monócitos em macrófagos, com expressão dos receptores TLR (*toll-like*) e ScR, pela ação do fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF), secretado pelas células inflamatórias da camada íntima. (4) Há a captação de partículas de LDL-ox a partir dos receptores ScR dos macrófagos, que ficam repletos de gordura. O colesterol oriundo da LDL-ox é esterificado e estocado nessas células. Os macrófagos repletos de gordura passam a ser reconhecidos como células espumosas, que se acumulam e formam as estrias de gordura (achado macroscópico da aterosclerose). (5) Por outro lado, o colesterol esterificado pode ser convertido para a forma livre e transferido para a HDL via transportadores. HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; ScR: receptor *scavenger* dos macrófagos. **Fonte**: adaptada de Glass e Witztum.[9]

grupos são mais vulneráveis ao desenvolvimento das DCV por apresentarem alterações em determinados genes que podem modificar o metabolismo envolvido com essas doenças.[16,17]

Na última década, avanços nas pesquisas envolvendo estudos de associação ampla do genoma (GWAS, *genome wide association studies*) e discussões acerca dos aspectos da genômica nutricional têm proporcionado evoluções na compreensão da fisiopatologia das DCV, bem como dos fatores genéticos associados.[18,19] Esse número crescente de estudos de genômica nutricional tem como objetivo instituir medidas personalizadas, tanto em termos de redução do risco quanto de tratamento das DCV e dos fatores de risco associados.

Dessa forma, este capítulo apresenta um panorama geral dos aspectos que relacionam as DCV com a nutrigenética e a nutrigenômica, com enfoque nas dislipidemias.

NUTRIGENÉTICA E DOENÇAS CARDIOVASCULARES

Aspectos gerais

Nas últimas décadas, as relações entre polimorfismos genéticos e o risco cardiovascular vêm sendo amplamente estudadas. A variabilidade entre os indivíduos em relação aos genes que codificam proteínas envolvidas no metabolismo de lipídios acarreta alterações no perfil lipídico sanguíneo. No entanto, os resultados das pesquisas podem ser controversos caso não seja considerada a relação entre polimorfismos e fatores ambientais.[20]

Nesse sentido, a nutrição apresenta-se como um dos principais fatores ambientais envolvidos no metabolismo dos lipídios. É consenso entre os pesquisadores o fato de alterações no perfil lipídico em resposta a intervenções alimentares serem diferentes para cada indivíduo. Sendo assim, é possível que uma recomendação nutricional em nível populacional não seja adequada individualmente. Dessa forma, estudos que avaliam as interações entre genes e alimentação buscam compreender os mecanismos envolvidos nas alterações lipídicas, a fim de contribuir para a redução do risco de DCV.[20]

Polimorfismos relacionados ao perfil lipídico: principais genes envolvidos

Ampla gama de estudos tem apontado relações entre polimorfismos genéticos em genes candidatos e o metabolismo lipídico no organismo humano. Entre os genes mais investigados estão os da proteína transportadora de ácidos graxos 2 (FABP2), do receptor de LDL (LDLr), da lipase de lipoproteína (LPL), da lipase hepática (LIPC), da proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP), da 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMGCR), dos transportadores cassete de ligação de ATP subfamília G, membros 5 e 8 (ABCG5 e ABCG8), da perilipina (PLIN), da proteína de ligação ao elemento regulador de esterois (SREBP), dos receptores ativados por proliferador de peroxissomos (PPAR-alfa, PPAR-gama), *cluster* das apolipoproteínas A1, C3, A4 e A5 (APOA1, APOC3, APOA4 e APOA5) e das apolipoproteínas A2, B e E (APOA2, APOB e APOE), abordados a seguir. Cabe ressaltar que essa relação não é definitiva e que as pesquisas em genômica nutricional incluem outros genes candidatos.[20]

FABP2

O gene *FABP2* tem localização cromossômica 4q28-q31 e codifica a proteína de mesmo nome, a qual é expressa nos enterócitos e atua na absorção, no metabolismo e no transporte de ácidos graxos. Polimorfismos no gene que codifica essa proteína podem alterar a sua sequência de aminoácidos e, consequentemente, interferir no fenótipo. O conjunto de variações -80_-79insT (rs5861422), -136_-132delAGTAG (rs5861423), -168_-166delAAGinsT (rs1973598), -260G>A (rs6857641), -471G>A (rs2282688) e -778G>T (rs10034579) na região promotora do gene da FABP2 resulta em dois haplótipos, A e B, amplamente relatados na literatura. Indivíduos carreadores do haplótipo A apresentam maior atividade transcricional do gene em comparação àqueles que carreiam o haplótipo B, o que tem sido associado a melhor resposta à insulina e à trigliceridemia pós-prandial.[21]

Outro polimorfismo com destaque na literatura é o Ala54Thr (rs1799883), o qual tem sido investigado em relação a parâmetros antropométricos e ao perfil lipídico, além da relação com a resistência à insulina. Um estudo com mexicanos adultos obesos, de ambos os sexos, avaliou a relação entre esse polimorfismo e fatores de risco cardiovascular. As frequências dos genótipos foram de 39% de homozigotos selvagens, 54,8% de heterozigotos e 6,2% de homozigotos para a variante, com frequência de 0,31 para o alelo variante. Os carreadores do alelo variante apresentaram índice de massa corporal (IMC) médio significativamente superior, bem como circunferência abdominal, concentrações séricas de TG, colesterol total, lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL-c) e risco cardiovascular aumentados (OR de 7,56, $p < 0{,}001$) em relação aos indivíduos homozigotos selvagens.[22] Outro estudo, com adultos mexicanos com sobrepeso ou obesidade, de ambos os sexos ($n = 109$), testou uma intervenção alimentar com consumo moderado de gorduras totais (30% do valor energético total – VET) e saturadas

(< 7% do VET) e a resposta dos diferentes genótipos em relação ao polimorfismo Ala54Thr. Os carreadores do alelo variante (Thr) apresentaram maior redução de peso, de medida da circunferência da cintura, do IMC e das concentrações séricas de proteína-C reativa (PCR) após a intervenção, quando comparados aos homozigotos selvagens.[23]

Outra investigação avaliou 116 mulheres e 86 homens argentinos, adultos e saudáveis quanto ao polimorfismo Ala54Thr e a possível relação com pressão arterial, escore de Framingham, perfil lipídico, IMC e glicemia. Do total, 52% dos indivíduos eram homozigotos selvagens, 40,6%, heterozigotos e 7,4%, homozigotos para a variante, com frequência do alelo variante de 0,27. Os autores encontraram tendência à significância para médias de IMC e de concentração de colesterol total maiores em carreadores do alelo variante quando comparados aos homozigotos selvagens.[24]

Em estudo realizado na Espanha, 264 indivíduos adultos obesos, de ambos os sexos, foram avaliados quanto ao polimorfismo Ala54Thr e marcadores de risco cardiovascular. A frequência do alelo variante foi de 0,28, com 58% de indivíduos homozigotos selvagens, 42% heterozigotos e 7,2% homozigotos para a variante. As concentrações séricas médias de PCR, biomarcador de risco cardiovascular, foram significativamente maiores entre os carreadores do alelo variante em relação aos homozigotos selvagens.[25]

Os resultados dos estudos sobre os polimorfismos no gene da FABP2 indicam que indivíduos carreadores de alelos variantes apresentam fenótipo desfavorável para perfil lipídico e antropométrico. Por outro lado, são mais responsivos à intervenção alimentar, como o controle da ingestão e da qualidade de gorduras. Dessa forma, novos estudos precisam elucidar os mecanismos pelos quais essas alterações genéticas interferem no controle do peso, do perfil lipídico e de biomarcadores inflamatórios.

LDLR

O gene *LDLR* está localizado na posição 13.2 do braço curto do cromossomo 19 (19p13.2) e codifica a proteína LDLr, sintetizada principalmente no fígado e localizada na superfície das células, onde atua como receptor de LDL. Ele liga-se às apolipoproteínas E (APOE) e B100 (APOB100) e atua na captação de remanescentes de quilomícrons (QM), de VLDL e de LDL do plasma sanguíneo, contribuindo para a homeostase do colesterol. Dessa forma, quando a concentração intracelular de colesterol diminui, a expressão do LDLr aumenta, assim como a captação de lipoproteínas circulantes, diminuindo a concentração sanguínea de colesterol.[26-28]

Nesse sentido, polimorfismos no gene que codifica o LDLr podem alterar sua estrutura e função, resultando no aumento das concentrações sanguíneas de LDL-c e associando-se ao desenvolvimento de dislipidemias, aterosclerose e doença arterial coronariana (DAC).[26,28] Mais de 1.600 mutações no gene do LDLr já foram associadas ao desenvolvimento de hipercolesterolemia familiar, podendo representar 85 a 90% das causas da doença.[28]

O polimorfismo rs688 (1773C>T) no gene que codifica o LDLr tem sido relacionado a alterações lipídicas e pode ser responsável por elevações de 4 a 10% nas concentrações de colesterol total.[26,28,29] Em mulheres da coorte de Framinghan, observou-se aumento de aproximadamente 10% nas concentrações de colesterol total e de LDL-c nas carreadoras do alelo T quando comparadas às carreadoras do genótipo selvagem. No entanto, essa associação parece ser específica para sexo, idade e metabolismo hormonal, uma vez que esses resultados não foram observados em homens ou em mulheres pós-menopausa da mesma coorte.[29]

Em um estudo com chineses de 35 a 74 anos de idade, de ambos os sexos, foram observadas associações entre dois polimorfismos de nucleotídeo único (SNP, *single nucleotide polymorphism*) no gene do LDLr e o perfil lipídico. Para o SNP rs1003723 (-30C>T), os carreadores do alelo variante apresentaram maiores concentrações de colesterol total e LDL-c quando comparados aos indivíduos homozigotos selvagens. Para o SNP rs6413504 (-42A>G), o mesmo padrão de resposta foi observado para as concentrações de colesterol total. Os autores avaliaram, ainda, a interação entre os SNP e o consumo alimentar na determinação do perfil lipídico. Nessa análise, observou-se que, entre os indivíduos com alto consumo de laticínios (> 124 g/dia), os carreadores do alelo G (rs6413504) apresentaram concentrações de TG 26% mais altas que os indivíduos AA. Os autores apontaram, por fim, a necessidade da realização de estudos que avaliem as interações entre polimorfismos genéticos, alimentação e perfil lipídico em populações de diferentes etnias.[30]

Franceschinni et al.[31] avaliaram a relação entre dois SNP no gene do LDLr e o risco de desenvolvimento de DAC em americanos (brancos ou afro-americanos). Os SNP avaliados foram o rs1433099 (C>T) e o rs2738466 (A>G), em que as frequências dos alelos T e G foram de 27% nos brancos e 54% nos afro-americanos e de 26% nos brancos e 17% nos afro-americanos, respectivamente. Nos indivíduos afro-americanos, os carreadores de um alelo variante (T) (rs1433099) apresentaram risco 23% maior de desenvolver DAC e os homozigotos para a variante (TT) apresentaram risco 47% maior, quando comparados aos indivíduos homozigotos selvagens (CC).

Essa relação não foi observada em indivíduos da etnia branca. O SNP rs2738466 não foi associado ao desenvolvimento da doença.

Dessa forma, nota-se que grande parte dos polimorfismos relacionados ao LDLr está associada a alterações metabólicas que refletem variações no perfil lipídico sanguíneo e podem interferir no risco de desenvolvimento de DCV.

LPL

O gene da *LPL* está localizado na região cromossômica 8p22 e faz parte de uma família de genes de lipases de TG que inclui as lipases hepática, pancreática e endotelial.[32] A LPL parece estar associada às concentrações sanguíneas de HDL-c e de TG. Essa relação pode ser modulada por fatores ambientais e de estilo de vida.[33]

A LPL é uma enzima sintetizada no tecido adiposo e nos músculos cardíaco e esquelético e, posteriormente, transportada para as células endoteliais dos vasos sanguíneos. A LPL participa da hidrólise de TG presentes nas lipoproteínas, possibilitando a liberação de ácidos graxos não esterificados e de glicerol para serem utilizados pelas células do organismo. A LPL está presente também na superfície dos macrófagos da camada íntima do endotélio sanguíneo e, provavelmente, contribui para o acúmulo de lipídios nessas células.[32]

A expressão da LPL é regulada de diversas maneiras, em resposta às necessidades de energia do organismo. Essa enzima está estreitamente relacionada a alterações metabólicas, como obesidade, diabete, dislipidemias e aterosclerose. Fatores como os glicocorticoides e a insulina são essenciais para o processo de tradução e transporte transmembrana da LPL. De fato, a insulina estimula a atividade da LPL, principalmente no tecido adiposo, por mecanismos transcricionais e pós-transcricionais.[32] Assim, polimorfismos no gene que codifica a LPL são objeto de estudos de genômica nutricional.

No estudo de Nettleton et al.,[34] incluindo adultos de duas etnias (afro-americanos e caucasianos), os carreadores do genótipo GG com relação ao SNP 1421C>G (Ser474Ter – rs328) no gene da LPL apresentaram maiores concentrações de HDL-c (4-12 mg/dL a mais) e menores concentrações de TG (6-17 mg/dL a menos) quando comparados aos indivíduos carreadores do alelo C. Essas características normalmente estão associadas a menor risco cardiovascular.

Em americanos brancos, o SNP 1421C>G no gene da LPL parece interagir com o consumo alimentar para influenciar o perfil lipídico sérico. No estudo de Nettleton et al.,[34] observou-se associação diretamente proporcional entre a ingestão de lipídios totais e as concentrações de HDL-c somente nos indivíduos carreadores dos genótipos CC e CG, ao passo que, para os indivíduos GG, essa relação foi inversa. Assim, quando a ingestão de lipídios foi baixa, os indivíduos GG apresentaram maiores concentrações de HDL-c que os demais. Nesse estudo não foram encontradas associações entre o SNP, a alimentação e as concentrações de TG.

Em um GWAS incluindo oito estudos populacionais envolvendo adultos de descendência europeia, Waterworth et al.,[35] relataram forte associação estatística entre SNP no gene da LPL e concentrações séricas de HDL-c (rs325) e TG (rs10105606), além da relação com o aumento do risco de desenvolvimento de DAC (rs10105606). Nesse estudo, os SNP no gene da LPL não foram associados às concentrações de LDL-c.

Estudo de coorte realizado na Coreia, com 5.314 indivíduos saudáveis entre 40 e 69 anos de idade, de ambos os sexos, avaliou as relações entre polimorfismos no gene da LPL, concentrações sanguíneas de HDL-c e TG e fatores relacionados ao estilo de vida (obesidade, tabagismo, consumo de álcool, atividade física e hábitos alimentares). As variáveis foram avaliadas no tempo inicial e ao final de 6 anos. Com base em dados de GWAS para genes relacionados às concentrações de TG e de HDL-c, o polimorfismo com maior associação foi o rs10503669, o qual se apresenta em forte desequilíbrio de ligação com o SNP Ser474Ter. Para esse haplótipo, os indivíduos carreadores do alelo variante (T) apresentaram maiores concentrações de HDL-c e menores concentrações de TG quando comparados aos homozigotos selvagens (GG).[33]

Em relação ao estilo de vida, os autores observaram associação entre o polimorfismo rs10503669 e o consumo de álcool e de ácidos graxos insaturados sobre as concentrações de HDL-c. Entre os indivíduos com genótipo homozigoto selvagem, aqueles que consumiam entre 1 e 15 g de álcool por dia apresentavam maiores concentrações de HDL-c que aqueles que não bebiam. No entanto, os que consumiam mais de 15 g de álcool por dia não apresentaram maiores concentrações da lipoproteína. Os carreadores do alelo variante que consumiam mais de 15 g de álcool por dia apresentaram maiores concentrações de HDL-c em comparação àqueles que não consumiam bebidas alcoólicas e aos indivíduos com genótipo homozigoto selvagem. Quanto ao consumo de ácidos graxos insaturados, entre os indivíduos carreadores do alelo variante, aqueles que mantinham um consumo elevado desses ácidos graxos apresentavam maiores concentrações de HDL-c. Para os indivíduos homozigotos selvagens, essa relação não foi observada. Nas concentrações de TG, foi observada associação entre o SNP rs10503669 e o IMC na determinação desse fator. Os indivíduos com genótipo homozigoto selvagem apresentaram associação

direta do IMC > 25 kg/m^2 com as concentrações de TG, enquanto os carreadores do alelo variante apresentaram relação inversa. Os autores dessa pesquisa sugeriram que os carreadores do alelo variante possam se beneficiar do consumo moderado de álcool e de uma alimentação rica em lipídios insaturados para evitar a redução das concentrações sanguíneas de HDL-c. Já indivíduos com excesso de peso, com genótipo homozigoto selvagem, beneficiar-se-iam da redução do peso para o controle das concentrações de TG.[33]

Nos estudos citados, os polimorfismos no gene da LPL mostraram associar-se a modificações no perfil lipídico sanguíneo, especificamente às concentrações de HDL-c e TG, além de estarem relacionados ao risco de desenvolvimento de DAC. Essas ações são, no entanto, dependentes da interação entre polimorfismos, consumo alimentar e características étnicas da população.

LIPC

O gene que codifica a LIPC está localizado no braço longo do cromossomo 15 (15q21-q23). A LIPC é uma enzima sintetizada e secretada pelo fígado que atua no metabolismo lipídico, agindo como mediadora da ligação e captação de lipoproteínas por proteoglicanos ou receptores de membrana e catalisando a hidrólise de TG e fosfolipídios contidos nas lipoproteínas plasmáticas. Durante essa última ação da LIPC, as partículas de LDL são modificadas para uma forma mais densa, menor e, portanto, mais aterogênica.[36,37] No entanto, os resultados dos estudos permanecem controversos, ora apontando a LIPC como um fator de risco para o desenvolvimento de DCV, ora descrevendo sua ação como antiaterogênica por mediar a captação de remanescentes de lipoproteínas sanguíneas, principalmente no período pós-prandial.[37]

Em razão de seu envolvimento no metabolismo das lipoproteínas, polimorfismos no gene que codifica a LIPC parecem estar relacionados a alterações das concentrações séricas de HDL-c e ao tamanho das partículas de LDL associadas ao risco cardiovascular.[34,38] Essa relação entre polimorfismos no gene da LIPC e o perfil lipídico sérico parece ser modulada pela quantidade de lipídios ingeridos por meio da alimentação.[34]

Em um GWAS incluindo oito estudos populacionais envolvendo adultos de descendência europeia, Waterworth et al.[35] relataram forte associação estatística entre o SNP (rs261334) no gene da LIPC e as concentrações séricas de HDL-c. Não foi observada relação entre esse SNP e as concentrações de LDL-c e TG ou o risco para DAC.

Nettleton et al.,[34] ao estudarem adultos afro-americanos e caucasianos, observaram que os carreadores do genótipo TT para o SNP -514C>T (rs1800588) apresentaram maiores concentrações de HDL-c (2-4 mg/dL a mais) quando comparados a indivíduos TC ou CC. No mesmo estudo, foram avaliadas interações entre o SNP e o consumo alimentar. Para os indivíduos caucasianos, não foi encontrada interferência do SNP sobre o perfil lipídico em respostas a diferentes composições da alimentação. Já no grupo de mulheres afro-americanas que mantinham baixo consumo de lipídios, as concentrações de HDL-c apresentaram-se aproximadamente 5 mg/dL mais baixas nas carreadoras do genótipo selvagem, em comparação às carreadoras de um ou dois alelos variantes. No entanto, quando o consumo de lipídios encontrava-se elevado, as concentrações de HDL-c eram semelhantes para as mulheres com genótipos CC e TT e aproximadamente 3,5 mg/dL inferiores naquelas com genótipo CT. Nos homens afro-americanos que mantinham alimentação rica em lipídios, as concentrações de HDL-c dos indivíduos com genótipo TT foram aproximadamente 4,5 mg/dL mais elevadas. Nos afro-americanos de ambos os sexos, com baixo consumo de lipídios saturados, as concentrações de TG apresentaram-se, em média, 5 mg/dL mais baixas nos indivíduos com genótipo CT em relação aos com genótipos CC e TT. No entanto, quando o consumo de lipídios saturados foi elevado, as concentrações de TG apresentaram-se 5 a 8 mg/dL mais baixas nos indivíduos com genótipo selvagem em relação aos carreadores de um ou dois alelos variantes. Dessa forma, observou-se associação entre aspectos da alimentação e o polimorfismo no gene da LIPC sobre o perfil lipídico, e essa associação apresentou-se dependente da etnia nesse estudo.

Em estudo realizado com inuítes, Rudkowska et al.[39] observaram que os carreadores do genótipo TT para o SNP -514C>T apresentaram maiores concentrações de TG em resposta a uma alimentação rica em lipídios totais e saturados. Os autores afirmam existir clara interação gene-alimentação envolvendo polimorfismos no gene que codifica a LIPC sobre o perfil lipídico sérico.

Ainda em relação ao SNP -514C>T, Ordovas et al.[37] estudaram voluntários da coorte de Framingham, entre 28 e 79 anos de idade, de ambos os sexos. Os carreadores do alelo T apresentaram maiores concentrações de HDL-c e maior diâmetro dessas partículas quando comparados aos indivíduos homozigotos selvagens. Esse fato foi atribuído à capacidade do alelo variante em diminuir a atividade da LIPC. Os autores observaram, ainda, forte associação entre o polimorfismo, a ingestão de lipídios e o perfil lipídico. O alelo T foi associado ao aumento das concentrações de HDL-c nos indivíduos que consumiam quantidades < 30% em relação ao VET de gorduras totais. No entanto, nos indivíduos com consumo de lipídios > 30% em relação ao VET, o genótipo TT foi associado à diminuição das concentrações de HDL-c. Quanto ao ta-

manho das partículas de HDL, nos indivíduos homozigotos selvagens (CC), o alto consumo de lipídios (> 30% do VET) foi associado a maiores partículas de HDL, ao passo que, nos carreadores do alelo T, a relação observada foi inversa.

Em outro trabalho, estudantes chineses, adultos e saudáveis, foram submetidos a uma dieta com alto teor de carboidratos (70% do VET) durante uma semana. Avaliaram-se as concentrações plasmáticas de TG, colesterol total, LDL-c, HDL-c, APOB100 e APOA1 ao início e ao final da intervenção e suas relações com o polimorfismo -250G>A (rs2070895) no gene da LIPC. Após a intervenção, a razão APOB100/APOA1 diminuiu apenas nos homens carreadores do alelo variante. As razões colesterol total/HDL-c e LDL-c/HDL-c diminuíram significativamente nos homens, independentemente do genótipo, e nas mulheres carreadoras do alelo variante. Já a razão TG/HDL-c aumentou nas mulheres, independentemente do genótipo, e não se alterou de forma significativa entre os homens. Os autores sugeriram que o alelo variante relativo a esse SNP está relacionado à menor razão APOB100/APOA1 em homens com alto consumo de carboidratos. Exceto para a relação TG/HDL-c em mulheres, o consumo de uma dieta com alto teor de carboidratos pareceu benéfico para o perfil lipídico sanguíneo, nesse estudo. No entanto, o período de intervenção alimentar foi curto e pode representar um viés nos resultados.[37]

O SNP -250G>A também foi estudado no trabalho de Andrade et al.[40] Os autores avaliaram adultos brasileiros e observaram a interação entre o polimorfismo e os hábitos alimentares desses indivíduos. Nesse estudo, o baixo consumo de alimentos de origem vegetal, ricos em fibras, foi associado a menores concentrações de HDL-c nos indivíduos homozigotos selvagens. Já nos carreadores do alelo variante, essa relação não foi encontrada.

Polimorfismos no gene da LIPC estão, portanto, associados a alterações no perfil lipídico sanguíneo, principalmente no que diz respeito às concentrações de HDL-c. Essas alterações são dependentes da interação entre polimorfismos, sexo, etnia e hábitos alimentares da população.

CETP

O papel da inibição da expressão da CETP como terapêutica para aumentar as concentrações de HDL-c tem sido documentado. O gene que codifica a CETP está localizado no braço longo do cromossomo 16 na posição 21, e os polimorfismos mais estudados desse gene são: rs708272 (C>T), rs1800775 (C>A), rs5882 (A>G), rs2303790 (A>G), rs1800776 (C>A), rs12149545 (G>A) e rs4783961 (G>A).

A função das partículas de HDL não se limita ao transporte reverso do colesterol. Partículas de HDL esféricas interagem com a CETP e transferem o colesterol esterificado para lipoproteínas remanescentes. Essa proteína apresenta grande similaridade com a proteína transportadora de lipopolissacarídeos, importante na imunidade inata. A inibição da CETP influencia, ainda, o processo inflamatório, a dinâmica do endotélio vascular, o processo trombótico e até mesmo a oxidação de lipídios. Nesse sentido, estudos sugerem a avaliação dos polimorfismos da CETP na determinação da incidência de infarto agudo do miocárdio (IAM). Metanálise avaliou a relação dos sete polimorfismos citados no gene da CETP com o risco de IAM em 8.623 casos e 8.564 indivíduos saudáveis. A presença do alelo variante para os polimorfismos rs708272 (C>T) e rs1800775 (C>A) relacionou-se com risco aumentado para IAM. Entretanto, os demais polimorfismos não foram associados com esse desfecho.[41]

Um estudo de coorte com 18.245 mulheres americanas, inicialmente saudáveis, avaliou mais de 350 mil polimorfismos em um estudo de GWAS com vistas a identificar os *loci* associados com as concentrações de HDL-c e a avaliar o papel dos SNP dentro de cada *locus* sobre a incidência de IAM durante um período de 10 anos de acompanhamento. Apenas os SNP no gene da CETP ou próximos foram associados com concentrações de HDL-c e com risco de IAM, destacando o papel da CETP no risco de desenvolvimento de DCV.[42]

O consumo regular de kiwi foi reconhecido por reduzir a razão TG/HDL-c, um marcador de resistência à insulina e da concentração de partículas pequenas de LDL, em homens adultos com hipercolesterolemia residentes na Nova Zelândia. Um grupo ingeriu durante quatro semanas duas unidades de kiwi por dia e recebeu orientação nutricional para uma alimentação saudável; o segundo grupo ingeriu os kiwis diariamente, mas não recebeu orientação nutricional. Quatro polimorfismos relacionados ao metabolismo da HDL foram avaliados: Taq1B no gene *CETP*; 275G>A no gene da APOA1; -514C>T no gene da LIPC e i24582 no gene da lipase endotelial (*LIPG*) quanto ao papel modulador do consumo de kiwi no perfil lipídico. A redução significativa da razão TG/HDL-c em homozigotos para a variante em relação ao polimorfismo *CETP* Taq1B após a intervenção com kiwi indicou que o consumo regular dessa fruta como parte de uma alimentação saudável pode melhorar o perfil lipídico de homens hipercolesterolêmicos com esse genótipo.[43]

Os estudos relatados na literatura apontam que o conhecimento do perfil genético em relação aos polimorfismos no gene da CETP é útil para direcionar intervenções de controle do perfil lipídico, sobretudo o aumento de HDL-c, e promissor para a redução dos riscos para DCV.

HMGCR

A HMGCR, uma glicoproteína transmembrana do retículo endoplasmático, catalisa a reação limitante na biossíntese do colesterol.[44] O tratamento medicamentoso da hipercolesterolemia com estatinas baseia-se no controle da atividade dessa enzima. Dessa forma, muitos estudos são conduzidos a fim de compreender a relação dos polimorfismos no gene da HMGCR com as concentrações de colesterol e o risco para DCV. Entre os SNP mais estudados nesse gene, estão o rs3761740 (-911C>A), o rs12916 (T>C) e o rs17238484 (G>T).

Um estudo caso-controle realizado na Turquia com 365 pacientes adultos com DAC e 365 controles avaliou a relação entre o polimorfismo -911C>A, o perfil lipídico e algumas variáveis antropométricas e socioeconômicas. Indivíduos homozigotos selvagens do sexo masculino com idade inferior a 55 anos apresentaram maiores concentrações de colesterol total em relação aos carreadores do alelo variante. Os autores sugeriram, a partir de análise de regressão multivariada, que o sexo e a idade influenciam o efeito do polimorfismo sobre as concentrações de LDL-c.[45]

Metanálise avaliou o efeito dos polimorfismos rs12916 (T>C) e rs17238484 (G>T) sobre o perfil lipídico e parâmetros antropométricos em 223.463 adultos provenientes de 43 estudos genéticos com várias etnias. A presença do alelo variante em relação a ambos os SNP foi associada a menores concentrações de LDL-c e ao maior peso corporal.[46] Outro estudo conduzido na Inglaterra avaliou homens e mulheres adultos participantes da coorte Epic (*The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*) e a possível interação entre o polimorfismo rs17238484 (G>T), a pressão arterial (PA) e a ingestão de cloreto de sódio. A análise de regressão múltipla indicou associação positiva e significativa entre a PA e o sódio urinário. Indivíduos carreadores do alelo variante apresentaram média de PA significativamente maior em relação aos homozigotos selvagens.[47]

Cabe destacar que polimorfismos no gene da HMGCR estão relacionados com o perfil lipídico (colesterol total e LDL-c). Além disso, algumas investigações sugerem relação com outros fatores de risco cardiovascular, como o peso corporal e a PA. Desse modo, o conhecimento do perfil genético em relação a esses polimorfismos pode ser valioso na redução do risco para as DCV em conjunto com outras medidas.

ABCG5/ABCG8

O efluxo de colesterol celular é uma das estratégias para garantir a homeostase dessa substância no organismo. A expressão dos genes *ABCG5* e *ABCG8*, que codificam os transportadores de mesma sigla (*ATP-binding cassette sub-family G members 5* e *8*), na membrana canalicular dos hepatócitos e na membrana apical dos enterócitos, resulta na formação de um heterodímero que atua no transporte do colesterol e de outros esteróis até a excreção no lúmen intestinal, processo apresentado na Figura 23.2.[48] Uma vez que os transportadores ABCG5 e ABCG8 contribuem para limitar a absorção intestinal de colesterol e para a excreção biliar de esteróis, justifica-se o grande número de estudos com SNP nos genes que os codificam. Esses polimorfismos podem contribuir para o acúmulo de esteróis e a formação de estrias de gordura no endotélio. Entre os principais estão o Gln604Glu (rs6720173) no gene do ABCG5 e os Asp19His (rs11887534), Tyr54Cys (rs4148211), Thr400Lys (rs4148217) e Ala632Val (rs199910445) no gene do ABCG8.

Metanálise investigou os polimorfismos citados nos genes do ABCG5/8 e a relação com as concentrações plasmáticas de colesterol. A avaliação considerou 16 estudos, com um total de 3.364 indivíduos (46,7 ± 10,5 anos de idade; IMC: 23,9 ± 3,5 kg/m^2). A presença do alelo variante 632V (rs6544718) foi associada a menores concentrações de LDL-c em relação a sua ausência. Os demais polimorfismos não foram associados com concentrações plasmáticas de colesterol. Essa revisão apontou associação discreta entre os polimorfismos nos genes do ABCG5 e ABCG8 com os marcadores de homeostase do colesterol.[49]

Uma coorte de 8 anos, com 131 homens e 154 mulheres entre 25 e 64 anos de idade, na República Tcheca, investigou a associação entre o perfil lipídico e a presença dos SNP citados em uma intervenção alimentar com redução no consumo de lipídios de origem animal e colesterol. O polimorfismo Tyr54Cys interferiu na diferença média entre as concentrações plasmáticas de colesterol total e LDL-c ao final em relação ao início do acompanhamento entre as mulheres (-0,49 e -0,57 mmol/L em indivíduos homozigotos selvagens *versus* 0,12 e 0,04 mmol/L em homozigotos para a variante, respectivamente). Já o polimorfismo Thr400Lys influenciou a redução média desses parâmetros entre os homens (para colesterol total e LDL-c, respectivamente: -0,90 e -0,62 mmol/L entre os homozigotos selvagens *versus* -0,30 e -0,19 mmol/L entre aqueles homozigotos para a variante). Os autores sugeriram que os SNP no gene *ABCG8* exercem papel sexo-específico na determinação das concentrações de colesterol após intervenção alimentar.[51]

Um estudo transversal com 1.046 chineses saudáveis entre 20 e 77 anos de idade (894 homens e 152 mulheres), com padrão alimentar tipicamente chinês, ava-

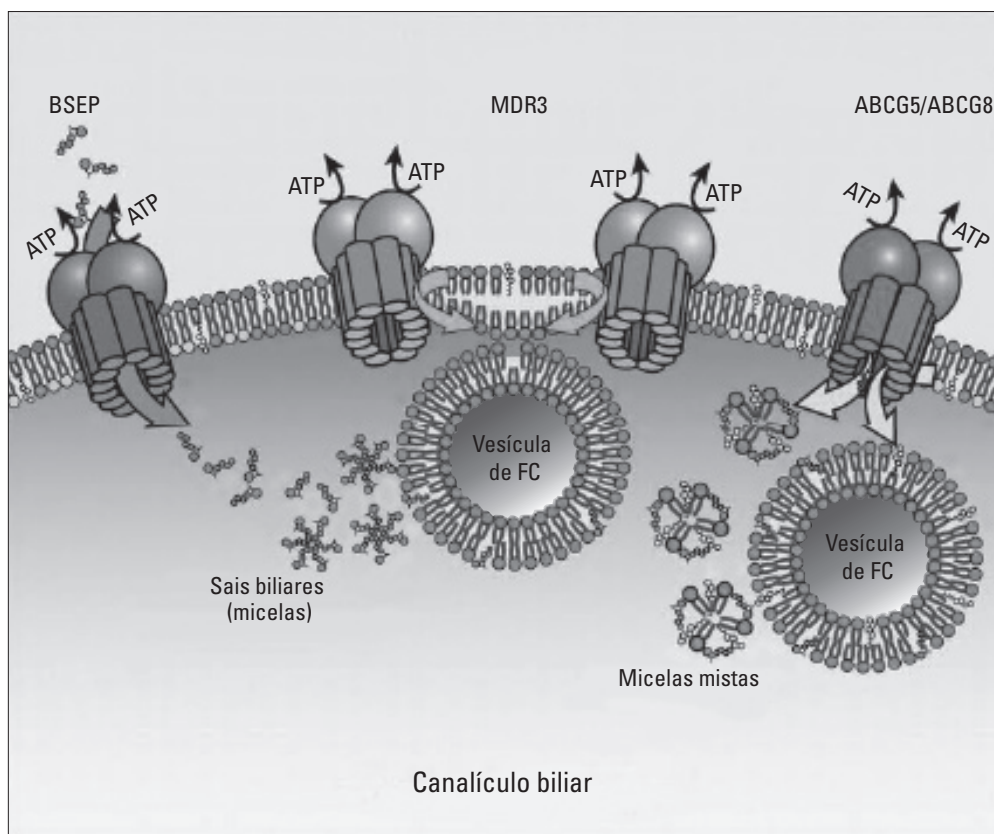



Figura 23.2 Ação do heterodímero ABCG5/ABCG8 no efluxo de colesterol no lúmen intestinal e na formação da bile. ABCG5/ABCG8: transportadores cassete de ligação de ATP subfamília G, membros 5 e 8; ATP: trifosfato de adenosina; BSEP: bomba de saída de sais biliares; FC: fosfatidilcolina; MDR3: proteína codificada pelo gene ABCG4. **Fonte:** Sarkadi et al.[50]

liou os polimorfismos já mencionados e a relação com o perfil lipídico e a resistência à ação da insulina. O polimorfismo Asp19His no gene do ABCG8 apresentou relação com as concentrações de colesterol total, de LDL-c e com o índice HOMA-IR. O genótipo heterozigoto, após ajuste por sexo e idade, associou-se significativamente com esses marcadores em relação aos indivíduos homozigotos selvagens. Os autores sugerem que esse polimorfismo possa ser um marcador para hipercolesterolemia, para altas concentrações de LDL-c e para resistência à ação da insulina.[52] Gylling et al.,[53] ao investigarem homens e mulheres moderadamente hipercolesterolêmicos, também encontraram resultados concordantes com os de Chen et al.[52]

Um estudo *crossover*, com 51 mulheres na pré-menopausa e 40 homens norte-americanos, avaliou o papel do polimorfismo Gln604Glu no gene do ABCG5 na resposta ao consumo de colesterol e carotenoides provenientes de ovos. A intervenção foi realizada durante 30 dias, com uma unidade de ovo integral liofilizado (640 mg de colesterol e 600 mg de luteína) ou ovo liofilizado sem gordura (placebo) por dia. O período de *washout* foi de três semanas. Os indivíduos homozigotos selvagens apresentaram aumento significativo nas concentrações de LDL-c e tendência de aumento nas concentrações de luteína após a intervenção em relação aos heterozigotos e homozigotos para a variante. Apesar do número restrito de participantes, os autores sugerem um provável efeito desse SNP na absorção dos carotenoides e do colesterol de origem alimentar.[54]

Diante do exposto, é plausível admitir o efeito dos polimorfismos nos genes do ABCG5 e ABCG8 nas concentrações de lipídios sanguíneos e, consequentemente, no risco cardiovascular.

PLIN

A PLIN, proteína que recobre a superfície das gotículas de gordura, está relacionada ao controle da lipólise. A isoforma PLIN5 tem sido associada à regulação da lipólise de TG nas células do músculo esquelético, de acordo com a demanda energética, e também à sensibilidade à insulina.[55] A PLIN5 também é reconhecida como reguladora fisiológica do metabolismo de TG e colesterol nos hepatócitos via fator de transcrição SREBP2 (proteína ligadora do elemento regulado por esteróis 2). Nos perío-

dos de jejum, a PLIN5 regula a lipólise de TG no tecido adiposo. Por outro lado, em casos de redução da expressão da PLIN5, a sinalização do fator de transcrição SREBP2 aumenta a expressão da HMGCR com vistas à homeostase do colesterol. Nesse sentido, essa proteína tem sido investigada quanto ao uso terapêutico em pacientes usuários de estatinas para o controle do perfil lipídico.[56]

Há evidências consistentes da relação entre a trigliceridemia pós-prandial e o risco cardiovascular. Com base nisso, Perez-Martinez et al.[57] avaliaram se os polimorfismos 6209T>C (rs2289487) no gene da PLIN1, 11482G>A (rs894160) no gene da PLIN4, 13041A>G (rs2304795) no gene da PLIN5 e 14995A>T (rs1052700) no gene da PLIN6 influenciam o metabolismo pós-prandial de lipídios em duas populações de etnia branca. A amostra analisou 271 norte-americanos (ambos os sexos) e 88 homens espanhóis, adultos e saudáveis. Os indivíduos realizaram um teste de carga oral de lipídios, e concentrações de colesterol total, TG e TG nas lipoproteínas plasmáticas foram mensurados em jejum e na fase pós-prandial. Em ambas as populações, os indivíduos carreadores do alelo variante para o SNP 6209T>C no gene da PLIN1 apresentaram menores concentrações pós-prandiais de TG em relação aos homozigotos selvagens. Entre os espanhóis, os carreadores do alelo variante para o SNP 11482G>A no gene da PLIN4, em comparação aos homozigotos selvagens, também tiveram menores concentrações pós-prandiais de TG. Os dois estudos indicam possível associação entre esses polimorfismos nos genes da PLIN1 e PLIN4 com uma resposta pós-prandial aos TG mais lenta, o que pode contribuir para menor risco aterogênico em pessoas saudáveis.

SREBP

A SREBP tem ação reguladora no metabolismo do colesterol e apresenta-se em três isoformas: SREBP-1a e SREBP-1c, codificadas pelo mesmo gene (*SREBF1*), e SREBP-2, codificada por um segundo gene (*SREBF2*). A SREBP-1a está envolvida no metabolismo do colesterol e dos ácidos graxos, a SREBP-1c atua na regulação de genes envolvidos na biossíntese de ácidos graxos e na diferenciação celular dos adipócitos e a SREBP-2 age na regulação dos genes envolvidos na homeostase do colesterol. As SREBP são ativadas quando as concentrações intracelulares de colesterol diminuem.[58,59]

Em razão da natureza de sua ação, polimorfismos nos genes da SREBP podem alterar o perfil lipídico e o risco para DCV.[59] Um estudo com chineses de ambos os sexos, com idade média de 58 anos, observou associação entre o SNP 1784G>C (rs2228314) no gene da SREBP-2 e o perfil lipídico. No entanto, o resultado foi encontrado apenas em mulheres hipercolesterolêmicas. Nesse grupo, as carreadoras do alelo C apresentaram maiores concentrações de colesterol total, LDL-c e HDL-c, em comparação às não carreadoras.[58]

Em outro estudo, apesar de não ter sido encontrada associação entre o perfil lipídico e o SNP 1784G>C no gene da SREBP-2, Robinet et al.[59] observaram relação entre a presença do alelo C e a espessura da íntima-média da carótida (*carotid IMT* – marcador de aterosclerose) em homens franceses, de 28 a 66 anos de idade, apresentando fatores de risco cardiovascular (dislipidemias, hipertensão e/ou tabagismo). Os autores sugeriram que esse SNP possa aumentar o risco de desenvolvimento de aterosclerose mesmo sem alterar o perfil lipídico.

Fan et al.[60] estudaram a relação entre o SNP 1784G>C no gene da SREBP-2 e o risco de morte cardíaca súbita em homens finlandeses com idade média de 52 anos. Quando esse polimorfismo foi avaliado individualmente, não foi encontrada associação com o risco em questão. No entanto, os autores observaram que a combinação do alelo C desse SNP com o alelo G do SNP 2386A>G no gene da SCAP (proteína ativadora da clivagem da SREBP) foi associada a maior risco de morte cardíaca súbita. Os autores sugerem que o risco aumentado esteja relacionado à presença de lesões ateroscleróticas mais complicadas e de trombose nesses indivíduos.

Quanto à SREBP-1a, em um estudo com homens franceses de 28 a 65 anos de idade apresentando fatores de risco cardiovascular (dislipidemia, hipertensão e/ou tabagismo), observou-se associação entre o polimorfismo de deleção no par de base -36 no sítio de iniciação de tradução (-36delG) e o perfil lipídico. O alelo G foi relacionado a maiores concentrações de colesterol total e LDL-c nesses indivíduos. Além disso, observou-se relação gene-gene, uma vez que houve interação dessa deleção com o genótipo da APOE. Nos carreadores do alelo ε4 para o gene da APOE, as concentrações de APOB e LDL-c foram maiores nos indivíduos com alelo G-. Os autores sugeriram, dessa forma, que a SREBP-1a e a APOE agem em conjunto na modulação do metabolismo das lipoproteínas sanguíneas.[61]

Laaksonen et al.,[62] em estudo realizado com 95 indivíduos finlandeses hipercolesterolêmicos de 26 a 69 anos de idade, de ambos os sexos, relataram associação entre o SNP sinônimo 952Gly/Gly (rs2297508) no gene da SREBP-1 e o metabolismo do colesterol. Os carreadores do genótipo CC apresentaram maior síntese de colesterol que os indivíduos que carreavam um ou dois alelos variantes (CG ou GG), reforçando a hipótese de relações entre polimorfismo no gene da SREBP-1 e o perfil lipídico. Esse resultado foi observado apenas nos homens, sugerindo também uma ação sexo-dependente.

Outro estudo também avaliou as interações entre o SNP 952Gly/Gly no gene da SREBP-1c e uma dieta rica em carboidratos sobre o perfil lipídico de chineses de ambos os sexos com idade média de 22,9 anos. Após 6 dias consumindo a dieta com 70% de carboidratos e sem restrição de energia, homens carreadores do alelo C apresentaram maiores concentrações de HDL-c e menores concentrações de APOB100. Nas mulheres carreadoras do genótipo GG, observou-se aumento das concentrações de TG, insulina e do índice HOMA-IR após a dieta.[63]

Os estudos têm encontrado, portanto, associações entre polimorfismos nos genes da SREBP-1 e SREBP-2 e o perfil lipídico dos indivíduos, bem como outros fatores de risco cardiovascular. Essa associação parece ser modulada pelas interações entre diversos genes e entre genes e fatores relacionados à alimentação.

PPAR

Os PPAR são receptores nucleares que atuam como fatores de transcrição. As isoformas conhecidas são PPAR-alfa, expressa nos rins, fígado, coração e músculos; PPAR-beta ou delta, expressa principalmente no músculo esquelético e coração; e PPAR-gama, sob as isoformas PPAR-gama 1, PPAR-gama 2 e PPAR-gama 3, expressas de maneira abundante no tecido adiposo, intestino grosso e rins.[64]

Os PPAR ligam-se a agonistas específicos, chamados de ativadores de PPAR (PGC). O papel desses receptores no metabolismo lipídico e no processo inflamatório tem sido elucidado no contexto das DCV por meio do estudo do controle transcricional de alguns genes. Uma vez ativados pelos agonistas, os PPAR modulam a expressão de genes ao ligarem-se ao elemento de resposta ao PPAR (PPRE) na região promotora desses genes. A indução efetiva da transcrição depende, ainda, da ligação do PPAR ao receptor do ácido retinoico 9-cis (RXR).[65]

Os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), como o ácido araquidônico e seus derivados eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos), são ativadores endógenos dos PPAR. Desse modo, desempenham função essencial sobre as respostas imune e inflamatória.[66]

PPARA

Os polimorfismos mais estudados no gene do PPAR-alfa são o Leu162Val (rs1800206) e o A>C no íntron 1 (rs135539). O primeiro é mais investigado em relação às dislipidemias e aos fatores de risco cardiovascular.

A lipoproteína (a) – Lp(a) – uma lipoproteína de baixa densidade, é considerada fator de risco independente para a aterosclerose. Com o objetivo de investigar possíveis relações entre os SNP do gene do PPAR-alfa e gama e as concentrações plasmáticas de Lp(a), Xie et al.[67] avaliaram 644 chineses adultos. Em relação ao polimorfismo Leu162Val no gene do PPAR-alfa, os indivíduos homozigotos selvagens (Leu/Leu) apresentaram concentrações plasmáticas médias de Lp(a) maiores em relação aos carreadores do alelo variante (Leu/Val e Val/Val). A análise de regressão multivariada também apontou associação significativa entre as concentrações plasmáticas de Lp(a) e os polimorfismos Leu162Val e rs135539 no gene do PPAR-alfa e 681C>G (rs10865710), Pro40Ala (rs1805192) e rs4684847 (SNP intrônico) no gene do PPAR-gama. Os autores sugeriram que esses polimorfismos estejam envolvidos na regulação das concentrações de Lp(a), isoladamente ou de maneira cumulativa, de modo a influenciar o risco para hipertensão arterial, aterosclerose e dislipidemias.

No Brasil, Mazzotti et al.[68] avaliaram 570 indivíduos adultos quanto ao polimorfismo Leu162Val e variáveis antropométricas e bioquímicas. A frequência do alelo variante (Val) foi de 0,052 e sua presença foi significativamente associada às dislipidemias em relação aos homozigotos selvagens.

PPARG

Os polimorfismos mais descritos na literatura para o gene do PPAR-gama são 681C>G, Pro40Ala, rs4684847 e Pro12Ala (rs1801282). Destes, o último é o mais frequentemente estudado e explorado em relação a metabolismo lipídico, obesidade, diabete tipo 2 e fatores de risco cardiovascular.

O polimosfirmo Pro12Ala resulta da troca de uma citosina por uma guanina na posição 34 do gene, no éxon 2, com consequente troca de prolina por alanina na posição 12 da proteína traduzida. Yen et al.,[69] em 1997, foram pioneiros ao triar os polimorfismos da região codificadora do gene do PPAR-gama em 26 indivíduos caucasianos com diabete tipo 2. A frequência do alelo variante Ala foi de 0,12 em caucasianos americanos, de 0,10 em mexicanos-americanos, de 0,08 em samoanos, de 0,03 em afro-americanos, de 0,02 em nauruanos e de 0,01 em chineses.

Rosado et al.[70] avaliaram o efeito dos SNP *PPARG* Pro12Ala e Gln27Glu (rs1042714) no gene do receptor beta-adrenérgico 2 (*ADRB2*) sobre o gasto de energia, a composição corporal e o comportamento alimentar em 60 brasileiras adultas. A oxidação de lipídios e a sensação de saciedade foram significativamente maiores nas pacientes carreadoras do alelo variante Ala em relação às homozigotas selvagens (Pro/Pro) em relação ao SNP *PPARG* Pro12Ala. Desse modo, a presença do alelo variante no gene do PPAR-gama 2 parece ser positiva no metabolismo lipídico.

Um estudo conduzido na Coreia avaliou 302 pacientes com AVE isquêmico, 283 controles saudáveis e 141

pacientes com diabete tipo 2 sem AVE isquêmico quanto ao polimorfismo Pro12Ala. A frequência do genótipo Pro/Ala em pacientes com AVE isquêmico com diabete tipo 2 foi significativamente diferente (2,3%) em relação aos controles (9,9%) e aos diabéticos tipo 2 sem AVE isquêmico (8,5%). Entretanto, a análise de regressão multivariada não detectou associação significativa desse polimorfismo com AVE isquêmico. Ainda assim, os resultados indicaram que o genótipo Pro/Ala (heterozigoto) pode estar associado à redução do risco de AVE isquêmico e exercer efeito protetor em pacientes diabéticos com AVE isquêmico.[71]

Apesar dos resultados ainda controversos, novos estudos que investiguem esse polimorfismo devem ser encorajados, uma vez que a influência sobre o risco cardiovascular já é confirmada.

A1/C3/A4/A5

Os genes das APOA1, C3, A4 e A5 estão localizados na região cromossômica 11q23-q24 em *cluster*, o qual parece estar relacionado ao desenvolvimento de hipertrigliceridemia, aterosclerose e DAC.[38,72] Polimorfismos nos genes que compõem esse *cluster* têm sido descritos como moduladores do perfil lipídico sérico.[38] Dessa forma, SNP nos genes do *cluster* A1/C3/A4/A5 já foram associados a alterações nas concentrações de HDL-c, LDL-c, TG, colesterol total, APOA1 e APOB.[37,39,73] Os genes desse *cluster* também parecem estar envolvidos na determinação do tamanho das partículas de LDL, fortemente relacionadas ao risco cardiovascular. No entanto, os resultados dos estudos permanecem controversos.[38]

APOA1

A APOA1 é uma proteína de 243 aminoácidos, sintetizada, principalmente, no fígado e no intestino, e representa o maior componente proteico da HDL. A APOA1 age como ativadora da enzima lecitina colesterol aciltransferase (LCAT), responsável pela esterificação do colesterol, auxiliando o transporte reverso desse lipídio.[72] Por estar envolvida no transporte reverso do colesterol, a APOA1 apresenta papel protetor contra DCV.[38,73,74]

Mais de 40 polimorfismos no gene da APOA1 já foram identificados, alguns deles relacionados a alterações no perfil lipídico sérico.[39,75] Entre os SNP descritos para esse gene, um dos mais estudados é o -75G>A (rs670 ou rs1799837). O alelo A, menos frequente, parece estar relacionado com as concentrações séricas de APOA1 e de HDL-c. No entanto, os resultados dos estudos em relação a esse SNP permanecem controversos, possivelmente em razão de interações com fatores ambientais capazes de modular o efeito do SNP.[37,72]

Em um estudo com indianos, de ambos os sexos, com idade média de 52,1 anos, o alelo variante (A) relativo ao SNP -75G>A foi associado a menores concentrações de HDL-c e de APOA1 e ao desenvolvimento de DAC.[72] Com resultado semelhante, estudo com adultos da coorte de Framingham, de ambos os sexos, com idade média de 54,6 anos, observou que as mulheres carreadoras do alelo A apresentaram menores concentrações de HDL-c em relação àquelas com genótipo GG.[37] Entretanto, em um estudo com adultos brasileiros, não foi encontrada relação entre esse SNP e as concentrações séricas de HDL-c. Essa associação foi observada apenas quando o polimorfismo foi combinado a SNP nos genes da CETP e da SCARB1.[40]

De acordo com Ordovas et al.,[37] os efeitos do SNP -75G>A no gene da APOA1 podem ser modulados pela ingestão de AGPI. Esses pesquisadores verificaram que mulheres da coorte de Framingham, carreadoras do alelo A, apresentaram maiores concentrações de HDL-c quando houve consumo elevado de AGPI (> 8% em relação ao VET da dieta). No entanto, quando o consumo de ômega-3 foi baixo (< 4% do VET), os carreadores do genótipo GG apresentaram concentrações de HDL-c 14% maiores em relação aos carreadores do alelo A. A equação de regressão exposta pelos autores sugere que, para cada aumento de 1% no consumo de AGPI em relação ao VET, as concentrações de HDL-c aumentaram em 0,046 mmol/L nas carreadoras do alelo A.

Rudkowska et al.[39] realizaram estudo com inuítes e avaliaram a variação no perfil lipídico em resposta ao consumo de lipídios totais e saturados e sua interação com polimorfismos, incluindo alguns localizados no gene da APOA1. Entre os indivíduos que mantinham uma alimentação rica em lipídios totais e saturados, os carreadores do genótipo heterozigoto (GA) relativo ao SNP -75G>A apresentaram maiores concentrações de LDL-c e os indivíduos com genótipo CC em relação ao SNP 84T/C (rs5070) apresentaram menores concentrações de HDL-c em comparação aos carreadores dos genótipos selvagens.

O SNP -75G>A, um dos mais estudados no gene da APOA1, parece influenciar o perfil lipídico, especificamente as concentrações de HDL-c e de APOA1, além do risco de desenvolvimento de DAC. Essa ação é dependente de interações com o consumo alimentar e a relação entre os dois fatores (genético e ambiental) precisa ser mais explorada por novas pesquisas.

APOC3

A APOC3 faz parte da composição das lipoproteínas ricas em TG (QM e VLDL) e da HDL. Ela é produzida principalmente no fígado e, em menor quantidade, no intestino delgado. Seu papel no metabolismo lipídico

envolve a inibição da atividade da LPL e da LIPC, enzimas que metabolizam os TG e facilitam sua remoção da circulação. A APOC3 também parece interferir na ligação da APOE a seus receptores e estimular a produção de VLDL. Em razão desses fatores, as concentrações plasmáticas da APOC3 estão diretamente relacionadas às concentrações de TG.[38,74,75] Alguns polimorfismos no gene da APOC3 parecem estar relacionados ao perfil lipídico sérico.[39]

Em um estudo com chineses Han de ambos os sexos, com idade média de 22,9 anos, foram observadas relações entre o polimorfismo SstI S1/S2 (3238C>G) na região 3'UTR do gene da APOC3 (rs5128) e o metabolismo lipídico. Nesse estudo, indivíduos carreadores do alelo S2 apresentaram menores concentrações de HDL-c e maiores concentrações de TG. Dessa forma, a razão TG/HDL-c foi maior nesses indivíduos quando comparados aos carreadores do genótipo S1S1. Esse resultado foi observado apenas nas mulheres, sugerindo associação sexo-dependente. Após seguir dieta rica em carboidratos (70% em relação ao VET), as mulheres carreadoras do alelo S2 apresentaram aumento significativo da razão TG/HDL-c em relação ao período anterior à dieta. Nas mulheres com genótipo S1S1, esse aumento não foi observado. Os autores sugeriram que a dieta rica em carboidratos intensifica os efeitos deletérios provocados pelo alelo S2.[76]

Por outro lado, estudos com populações étnicas diferentes verificaram influência do alelo S2 também no perfil lipídico de homens, sugerindo ação não somente sexo-dependente, mas também relacionada à etnia.[77,78]

Em um estudo com inuítes, Rudkowska et al.[39] observaram que os carreadores do alelo S1 relativo ao SNP SstI S1/S2 apresentaram maiores concentrações de LDL-c em resposta a uma alimentação rica em lipídios totais e saturados. O mesmo grupo de pesquisadores avaliou a relação entre o SNP rs5128, o perfil lipídico sérico e a concentração de ômega-3 nos eritrócitos (ácido eicosapentaenoico [EPA], ácido docosapentaenoico [DPA] e ácido docosa-hexaenoico [DHA]). Os autores observaram que os carreadores do alelo variante (S2 ou G) com percentual elevado de AGPI ômega-3 (EPA, DHA e DPA) nos eritrócitos apresentavam maiores concentrações de APOB100 e maior razão colesterol total/HDL-c, sugerindo que, para esses indivíduos, o alto consumo de ômega-3 pode não ser benéfico.[79]

Os estudos sugerem, portanto, associação entre o SNP SstI S1/S2 no gene da APOC3 e o perfil lipídico dos indivíduos. Essa relação é dependente de sexo, etnia e hábitos alimentares.

APOA4

A APOA4 está presente em QM e na HDL e seu papel no metabolismo lipídico ainda não está claramente definido.[74] No entanto, é proposta uma ação antiaterogênica para essa apolipoproteína. A APOA4 parece influenciar a absorção de lipídios provenientes da alimentação e a formação de QM, bem como modular a ativação da LPL pela APOC2 e ativar a LCAT, que participa do transporte reverso do colesterol.[73] A síntese de APOA4 pelo intestino é estimulada pela absorção de ácidos graxos de cadeia longa.[80] Polimorfismos no gene da APOA4 parecem relacionar-se ao perfil lipídico sérico.[39]

Delgado-Lista et al.[73] observaram, em homens espanhóis normolipidêmicos, de 18 a 33 anos de idade, associação entre polimorfismos e perfil lipídico pós-prandial. Nesse estudo, indivíduos com genótipo heterozigoto para os SNP Asn147Ser (rs5104) e Thr29Thr (rs5092) apresentaram menores concentrações de APOA1 que aqueles com genótipo homozigoto selvagem. Os efeitos desses SNP não se mostraram independentes um do outro. Os autores sugerem que SNP no gene da APOA4 influenciam, de alguma forma, a disponibilidade de HDL no estado pós-prandial e, ainda, que a influência dos SNP no gene da APOA4 sobre as concentrações de APOA1 possa ocorrer em razão de modificações na transferência de TG dos QM para as moléculas de HDL ou da diminuição da síntese da APOA1 no estado pós-prandial.

Um estudo com inuítes avaliou a associação entre uma variação no gene da APOA4 – SNP Asn147Ser (440 G/A – rs5104) –, a concentração de ômega-3 (EPA, DHA e DPA) nos eritrócitos e o perfil lipídico sérico. Observou-se relação direta entre as concentrações de ômega-3 nos eritrócitos e as concentrações sanguíneas de APOB100 em carreadores do alelo G. Quando as concentrações de ômega-3 nos eritrócitos e o perfil lipídico foram avaliados na população total, sem a classificação genotípica, essa relação não foi observada. Os autores sugerem que os carreadores do alelo variante para esse polimorfismo apresentam maior sensibilidade a alterações no consumo de lipídios.[79]

Buscando relacionar o consumo de lipídios com o risco cardiovascular, Canales et al.[80] avaliaram, em estudo do tipo *crossover,* adultos espanhóis saudáveis quanto ao polimorfismo Gln360His (rs5110) no gene da APOA4. Esses indivíduos seguiram dois tipos de dieta, a primeira incluindo o consumo de carne com baixo teor de lipídios e a segunda, a ingestão de carne adicionada de pasta de nozes. Cada intervenção foi seguida por cinco semanas, com um intervalo de quatro a seis semanas entre elas. A dieta incluindo carne com pasta de nozes continha maior proporção de AGPI, menor razão ômega-6/ômega-3 e menor proporção de ácidos graxos saturados. Marcadores de agregação plaquetária, de produção de eicosanoides e de trombogênese foram avaliados. Os autores concluíram que a substituição de carnes com baixo teor de gordura

por carnes enriquecidas com pasta de nozes pode auxiliar na diminuição do risco trombogênico em adultos. No entanto, esse efeito foi modulado pelo polimorfismo Gln360His, uma vez que, quando consumiram a dieta com carne e pasta de nozes, os indivíduos carreadores do alelo selvagem (Gln) apresentaram maior diminuição na produção de tromboxano B2 (que favorece a agregação plaquetária) quando comparados aos indivíduos homozigotos para a variante (His). No entanto, em relação à produção de prostaciclina I2 (inibidora da agregação plaquetária), os carreadores do alelo variante (His) apresentaram produção reduzida no período em que consumiram a dieta contendo carne com nozes, enquanto os carreadores do alelo selvagem (Gln) apresentaram aumento dessa produção. A agregação plaquetária diminuiu em todos os indivíduos após o período de intervenção, independentemente do genótipo.[80]

Os estudos aqui apresentados sugerem associação entre SNP no gene da APOA4 e o perfil lipídico dos indivíduos por ações no metabolismo lipídico moduladas pelo consumo alimentar. Além disso, polimorfismos nesse gene parecem envolver-se com o risco trombogênico, um fator relacionado ao risco cardiovascular.

APOA5

A APOA5 é sintetizada no fígado e encontrada, principalmente, nas moléculas de HDL, mas também pode ser transferida para as VLDL no estado pós-prandial. Ela está envolvida no metabolismo das lipoproteínas ricas em TG e, para isso, dois mecanismos de ação foram propostos na literatura. O primeiro envolve a síntese de VLDL e o segundo sugere a participação da APOA5 como ativadora da lipólise de TG pela LPL.[81,82] Sua concentração plasmática relaciona-se inversamente às concentrações de TG,[74] e é menor em relação às demais apolipoproteínas.[38]

Com base em cinco SNP no gene da APOA5 (-1131T>C, -3A>G, 56C>G ou Ser19Trp, 476G>A, e 1259T>C), foram definidos três haplótipos comuns: APOA5-1, APOA5-2 e APOA5-3. Em um estudo com homens espanhóis saudáveis, com idade média de 23 anos, os carreadores dos haplótipos APOA5-2 e 3 apresentaram maiores concentrações pós-prandiais de TG e de lipoproteínas ricas em TG em comparação aos carreadores do haplótipo APOA5-1. Os autores sugeriram que os haplótipos 2 e 3 estão associados a maior resposta pós-prandial, o que pode resultar em maior risco de desenvolvimento de DAC e, ainda, que esse fato está associado aos alelos C e G (ou Trp) dos SNP 1131T>C e Ser19Trp, respectivamente.[83]

Em estudo realizado com indivíduos americanos de ambos os sexos com idade média de 59,3 anos, o SNP Ser19Trp no gene da APOA5 relacionou-se às concentrações de HDL-c, de APOA1 e ao desenvolvimento de aterosclerose. Os indivíduos carreadores do genótipo heterozigoto apresentaram maior risco cardiovascular.[84]

Andrade et al.[81] avaliaram interações entre o SNP Ser19Trp (rs3135506) em brasileiros de ambos os sexos com idade média de 43,3 anos. Carreadores do alelo Trp apresentaram maiores concentrações de TG que os não carreadores. Essa relação foi mais intensa nas mulheres, principalmente no período da menopausa. Os autores observaram, ainda, a interação gene-gene entre esse SNP da APOA5 e o genótipo da APOE. Entre carreadores do alelo Trp, o aumento das concentrações de TG foi intensificado pela presença do alelo ε4 relativo ao gene da APOE. Os autores não encontraram associação do SNP Ser19Trp e hábitos de vida (tabagismo, sedentarismo e consumo de álcool) com o perfil lipídico.

Para o SNP -1131 T>C (rs662799), os carreadores do alelo C parecem apresentar maiores concentrações plasmáticas de TG e de VLDL-c e menores concentrações de HDL-c e de APOA5, além de apresentarem moléculas de VLDL maiores e LDL menores, as quais são relacionadas ao aumento do risco para DCV.[82,85] Além disso, Kang et al.[85] verificaram que esse polimorfismo interage com fatores alimentares, resultando em diferentes perfis lipídicos. Os autores avaliaram os efeitos desse SNP sobre as concentrações séricas de APOA5 e de TG em coreanos de ambos os sexos, com glicemia de jejum aumentada e que seguiram dieta com diferentes fontes de carboidratos (grãos integrais e legumes – intervenção; e arroz branco – controle) por 12 semanas. Os indivíduos que seguiram dieta rica em grãos integrais e hortaliças apresentaram aumento nas concentrações de HDL-c e de APOA5, independentemente do genótipo. Quanto ao grupo controle, os carreadores do alelo C apresentaram aumento nas concentrações de TG e de APOA5, marcadores que permaneceram inalterados nos indivíduos TT. Dessa forma, os autores concluíram que indivíduos com glicemia de jejum alterada e carreadores do alelo C são mais suscetíveis aos efeitos adversos de uma dieta contendo arroz branco e apresentam maior predisposição ao aumento das concentrações de TG, mesmo quando há aumento da APOA5, em comparação a indivíduos TT.

Lai et al.[82] encontraram associação entre o SNP -1131 T>C, o consumo de AGPI (>6 ou <6% do VET) e as concentrações de TG em adultos de ambos os sexos participantes da coorte de Framingham. Carreadores do alelo C apresentaram maiores concentrações de TG apenas quando o consumo de AGPI foi superior a 6% do VET. Quando esse consumo foi inferior a 6% do VET, não foi encontrada diferença nas concentrações de TG entre os indivíduos com diferentes genótipos. Essa interação foi

atribuída ao aumento do consumo de AGPI ômega-6, já que a ingestão de ômega-3 não foi associada ao aumento das concentrações de TG. Dessa forma, os autores relataram o papel dos AGPI na modulação dos efeitos genéticos sobre o perfil lipídico plasmático.[82]

No estudo de Mattei et al.,[86] realizado com adultos porto-riquenhos, nenhuma diferença no perfil lipídico sérico foi encontrada em função do genótipo dos indivíduos com relação ao SNP -1131 T>C. No entanto, no grupo que tinha o consumo de lipídios superior a 31% em relação ao VET, os carreadores do alelo C apresentaram maiores concentrações de TG e de colesterol total em relação aos indivíduos TT. Por outro lado, essa diferença entre os genótipos não foi encontrada quando o consumo de lipídios estava abaixo de 31% do VET. Dessa forma, os autores sugeriram que, em relação ao perfil lipídico sérico, indivíduos porto-riquenhos carreadores do alelo C podem se beneficiar mais do baixo consumo de lipídios que indivíduos com genótipo TT. Sugeriram ainda que, nessa população, o SNP -1131 T>C no gene da APOA5 provavelmente não apresenta papel direto na modulação do perfil lipídico, mas que essa ação depende da interação com a alimentação.

Ainda em relação ao SNP -1131 T>C no gene da APOA5, Sánches-Moreno et al.[87] descreveram resultado controverso em relação aos demais estudos citados. Os autores encontraram relação inversa entre o consumo de lipídios e as concentrações de TG e de VLDL-c em adultos espanhóis carreadores do alelo C com sobrepeso ou obesidade. Não houve associação entre o consumo alimentar e o perfil lipídico nos carreadores do genótipo TT. Os autores sugeriram que os carreadores do alelo C podem ser mais resistentes aos efeitos nocivos de uma alimentação rica em lipídios, mas ressaltaram que, na alimentação da população estudada, mais de 50% das calorias provenientes de lipídios eram oriundas do consumo de ácidos graxos monoinsaturados, com destaque para o azeite de oliva.

Ao estudarem uma população inuíte, Rudkowska et al.[79] observaram relações entre alguns SNP, concentração de ácidos graxos ômega-3 (EPA, DHA e DPA) nos eritrócitos e perfil lipídico sérico. Entre os indivíduos que apresentam maiores concentrações de ômega-3 nos eritrócitos, os carreadores do alelo G relativo ao SNP -3A/G (rs651821) e os carreadores do alelo C relativo ao SNP -1131T/C apresentaram maiores concentrações de LDL-c, de APOB100 e da razão colesterol total/HDL-c, bem como menores concentrações de HDL-c.

Já Hubacek et al.[88] e Paula et al.[89] não encontraram associações estatisticamente significativas entre SNP no gene da APOA5 e o consumo de lipídios sobre o perfil lipídico sérico de adultos europeus e de idosas brasileiras, respectivamente.

Polimorfismos no gene da APOA5 parecem, portanto, exercer efeitos sobre o perfil lipídico dos indivíduos, os quais são modulados pelo sexo, metabolismo hormonal e consumo alimentar. Além disso, o gene da APOA5 mostrou interação com o gene da APOE na determinação do perfil lipídico e associação com o risco de desenvolvimento de aterosclerose.

APOA2

A APOA2 é o segundo maior componente proteico da HDL e seu papel no metabolismo lipídico ainda não foi totalmente esclarecido. No entanto, parece influenciar a ação de enzimas do metabolismo lipídico (LIPC, CETP, LCAT); as concentrações sanguíneas de glicose, de ácidos graxos livres e de insulina; e o *clearance* de lipoproteínas ricas em TG. As partículas de HDL contendo APOA2 parecem ter ação reduzida em comparação àquelas contendo APOA1, o que prejudica o metabolismo do colesterol. Apesar dos dados ainda apresentarem-se controversos, a APOA2 tem sido apontada como pró-aterogênica, relacionando-se com hipertrigliceridemia, obesidade e resistência à insulina. Entre os diversos polimorfismos no gene da APOA2 já descritos, o SNP -265T>C (rs5082) tem sido amplamente relacionado ao perfil lipídico.[90,91]

Indivíduos com o genótipo CC para o polimorfismo -265T>C parecem apresentar menores concentrações dessa apolipoproteína e menor IMC. No entanto, no estudo de Corella et al.[90] com indivíduos adultos das coortes Framingham, The Genetics of Lipid Lowering Drugs and Diet Network Study e The Boston-Puerto Rican CPHHD Study, a relação entre o SNP e o IMC somente foi observada quando o consumo de ácidos graxos saturados foi elevado (> 22 g/dia), sugerindo papel modulador da alimentação sobre os efeitos do polimorfismo na composição corporal. Os indivíduos com genótipo CC também apresentaram maior consumo energético e de macronutrientes em comparação aos carreadores do alelo T. Os autores sugeriram que esse polimorfismo influencia o consumo alimentar em obesos.

Ainda em relação ao SNP -265T>C, Delgado-Lista et al.[91] observaram, em homens espanhóis normolipidêmicos de 18 a 33 anos de idade, associação entre o polimorfismo e o perfil lipídico pós-prandial (os indivíduos consumiram refeição rica em lipídios e enriquecida com vitamina A). Todos os homens participantes apresentavam genótipo ε3/ε3 relativo ao gene da APOE a fim de evitar interferências nos resultados. Nesse estudo, os carreadores do genótipo TT relativo ao SNP -265T>C apresentaram concentrações de TG mais elevadas no período pós-prandial quando comparados aos carreadores do alelo C. Os autores sugeriram que estes últimos apresentam menor

resposta pós-prandial e, possivelmente, menor risco cardiovascular.

Hooft et al.,[92] em estudo envolvendo homens suecos, saudáveis, de 50 anos de idade, observaram que os carreadores do alelo C para o SNP -265T>C apresentaram menores concentrações de APOA2 e de moléculas grandes de VLDL-c (esta última no período pós-prandial). Os autores relacionaram a menor concentração de APOA2 nesses indivíduos à melhor capacidade de remoção de moléculas grandes de VLDL-c do plasma. Por fim, nesse estudo, o alelo C foi associado à menor circunferência da cintura, sugerindo papel modulador do SNP sobre a adiposidade visceral.

Polimorfismos no gene da APOA2 parecem, portanto, modular o perfil lipídico, especialmente no estado pós- -prandial, relacionando-se ao consumo alimentar e à composição corporal.

APOB

A APOB apresenta-se em duas formas: APOB48 (produzida no intestino) e APOB100 (produzida no fígado). A APOB48 está presente nos QM e participa da absorção e do transporte de lipídios para o fígado, enquanto a APOB100 age como ligante para o LDLr.[93] A APOB é a única apolipoproteína da LDL e é essencial para a produção e a secreção de lipoproteínas ricas em TG.[94]

Diversos polimorfismos no gene da APOB já foram associados ao desenvolvimento de hipercolesterolemia familiar. No estudo de Lye et al.,[95] realizado com adultos com idade média de 46,8 anos, de ambos os sexos, residentes na Malásia, observou-se associação entre sete SNP (rs13306187, rs13306194, rs12714238, rs12720772, rs12720762, rs41291161 e rs12714254) no gene da APOB e o desenvolvimento de hipercolesterolemia familiar. O SNP rs12720762 foi associado com maior risco de desenvolvimento de hipercolesterolemia familiar, com *odds ratio* igual a 14,78. Já o SNP rs57825321 foi relatado como protetor contra o desenvolvimento da doença. Além disso, os SNP rs13306194 e rs57825321 foram associados às concentrações de HDL-c e o rs12720772 foi associado às concentrações de colesterol total e ao IMC.

Em um GWAS utilizando dados de oito estudos populacionais com adultos europeus, Waterworth et al.[35] encontraram forte associação entre variações no gene da APOB, concentrações séricas de LDL-c e risco para DAC. Com relação ao SNP rs1367117 (56C/T), os carreadores do alelo T parecem apresentar maiores concentrações de APOB, quando comparados aos indivíduos CC.[30]

Kim et al.,[93] em estudo realizado com voluntários do *Clear Study*, relataram interação entre polimorfismos no gene da APOB e o consumo de colesterol sobre as concentrações séricas de colesterol total. Para o SNP rs1042034 (Ser4338Asn), nos carreadores do alelo mais frequente, houve associação direta entre o consumo de colesterol e as concentrações sanguíneas de colesterol total. Os autores sugeriram que o SNP interfere na absorção e/ou no metabolismo do colesterol ingerido.

Outro estudo, realizado com uma população de inuítes de ambos os sexos e com idade média de 37 anos, encontrou relação entre o SNP XbaI (7673C>T ou Thr-2488Thr) (rs693) no gene da APOB e o perfil lipídico. Nesse caso, entre os indivíduos que mantinham uma alimentação rica em lipídios totais e em ácidos graxos saturados, os carreadores do alelo T apresentaram maior aumento de colesterol total e de LDL-c. Os autores alertaram para o maior risco de desenvolvimento de hipercolesterolemia nesses indivíduos.[39]

Os estudos aqui abordados sugerem associações entre polimorfismos no gene da APOB e o desenvolvimento de hipercolesterolemia familiar, de DAC e o perfil lipídico, especialmente concentrações de APOB, LDL-c e colesterol total, sendo esses efeitos influenciados pelo consumo alimentar.

APOE

A APOE tem importância fundamental no metabolismo das lipoproteínas ricas em TG e da HDL, uma vez que atua como ligante para o receptor de LDL, medeia a captação de QM e de remanescentes de VLDL e participa do transporte reverso do colesterol.[38,96,97] Entre os SNP no gene da APOE, os rs429358 e rs7412 são os mais estudados e determinam três alelos comuns: ε2 (10%), ε3 (60%) e ε4 (30%). Esses alelos dão origem a três isoformas da APOE (APOE2, APOE3 e APOE4), que diferem entre si pela composição em aminoácidos na estrutura da proteína.[38,98]

Nos últimos 30 anos, a relação entre o genótipo da APOE e o risco cardiovascular vem sendo intensamente estudada. Indivíduos carreadores do alelo ε4 parecem apresentar aumento de 40 a 50% no risco cardiovascular em relação aos indivíduos ε3/ε3.[99] Esse risco provavelmente encontra-se aumentado em razão das maiores concentrações de LDL-c e de TG apresentadas por esses indivíduos. Estima-se, ainda, que a variação alélica no gene da APOE seja responsável por 5 a 7% das alterações nas concentrações de colesterol total em indivíduos caucasianos saudáveis.[38,97,98,100] Acredita-se que essa variação no perfil lipídico e no risco cardiovascular ocorra em razão da maior afinidade da APOE4 por seus receptores em comparação às outras isoformas.[99]

O genótipo da APOE também vem sendo estudado como modulador do efeito da ingestão de lipídios no

perfil lipídico individual.[38,97,98,100] Os indivíduos carreadores do alelo ε4 parecem ser mais responsivos a modificações no consumo de lipídios totais, de colesterol, de óleo de peixe e de álcool. Além disso, a variabilidade na resposta ao consumo de dieta rica em carboidratos também vem sendo estudada.[99]

No estudo de Carvalho-Wells et al.,[97] incluindo adultos do Reino Unido, os carreadores de um alelo ε4 (ε3/ε4) apresentaram maior redução nas concentrações de TG ao consumirem altas doses de DHA (3,7 g/dia) quando comparados a indivíduos ε3/ε3. Os autores sugerem que isso ocorra em razão da maior atuação da isoforma APOE4 na remoção de remanescentes de VLDL da circulação em comparação com as isoformas E2 e E3, as quais parecem ter maior atividade no metabolismo da HDL. Além disso, as concentrações iniciais de TG nos carreadores do alelo ε4 eram mais elevadas. O mesmo estudo mostrou aumento das concentrações séricas de PCR em resposta ao maior consumo de ácidos graxos saturados apenas nos carreadores do alelo ε4. Os autores sugeriram que os indivíduos ε4/ε4 representam um grupo com alta sensibilidade às alterações no consumo de lipídios. Concluíram, ainda, que a magnitude da interação entre o genótipo da APOE e as mudanças nas concentrações de LDL-c em resposta à intervenção alimentar não é homogênea e, ainda, depende das doses de DHA administradas, do perfil lipídico plasmático e do consumo habitual de lipídios.

No estudo de Andrade et al.,[40] realizado com adultos brasileiros, os resultados foram inversos aos de Carvalho-Wells et al.[97] O consumo frequente de AGPI foi associado a maiores concentrações de LDL-c e a menores concentrações de HDL-c nos carreadores do alelo ε4. Já nos carreadores do alelo ε2, o consumo frequente de AGPI foi relacionado a menores concentrações de TG. Em homens que consumiam azeite de oliva frequentemente (uma vez por semana ou mais), as concentrações de LDL-c apresentaram-se mais baixas apenas nos carreadores do alelo ε2, ao passo que os demais indivíduos não se beneficiaram do consumo desse alimento. Por outro lado, o consumo frequente de azeite foi associado a aumento das concentrações de TG nos carreadores do ε4. Os autores sugerem que a presença da isoforma E4 da APOE modifique o efeito dos diferentes tipos de lipídios sobre o perfil lipídico individual. Ainda nesse estudo, o baixo consumo de alimentos ricos em lipídios e sacarose foi relacionado a menor concentração de colesterol total apenas nos carreadores do alelo ε2. Os carreadores dos alelos ε2 e ε3 apresentaram menores concentrações de colesterol total quando o consumo de chocolate era frequente (uma vez por semana ou mais), mas nos carreadores do alelo ε4 essa relação não foi observada.

Erkkilä et al.[100] também observaram associação entre o maior consumo de sacarose e concentrações mais elevadas de TG somente nos carreadores do alelo ε2, em comparação com carreadores dos alelos ε3 e ε4. Os autores sugeriram que o alelo ε2 esteja associado ao metabolismo prejudicado dos QM e de remanescentes de VLDL, contribuindo para a hipertrigliceridemia. Já o maior consumo de ácidos graxos saturados foi associado ao aumento do colesterol total apenas nos indivíduos carreadores do alelo ε3.

É notável, portanto, a associação entre as isoformas da APOE e o perfil lipídico sérico, a qual pode modificar o risco de desenvolvimento de DCV. Essa relação é influenciada pelos hábitos alimentares. Carreadores do alelo ε4 parecem ser mais sensíveis a mudanças no consumo de lipídios, enquanto carreadores do alelo ε2 parecem ser mais responsivos a mudanças no consumo de carboidratos.

NUTRIGENÔMICA E DOENÇAS CARDIOVASCULARES

O desenvolvimento tecnológico tem permitido avanços na compreensão dos mecanismos envolvidos nas interações entre genes e nutrientes, especificamente da influência da alimentação no padrão de expressão gênica (nutrigenômica). A tecnologia de *microarrays* fornece informações específicas sobre genes de interesse, e também permite a avaliação da expressão de vários deles simultaneamente. Essa expressão está relacionada ao desenvolvimento de DCNT e pode ser regulada, entre outros fatores, pela alimentação. Sendo assim, já foi observado que dietas hipocalóricas podem regular a expressão de genes envolvidos nas vias glicolíticas e lipídicas e, ainda, que a distribuição de macronutrientes pode interferir na expressão de genes envolvidos nos processos inflamatórios. Com relação às DCV, já é reconhecida a relação entre o perfil de lipídios da alimentação e o fenótipo em relação ao perfil lipídico no sangue.[101,102] Nesse sentido, entre os padrões alimentares mais estudados em nutrigenômica e DCV, está a dieta mediterrânea.

Dieta mediterrânea

A dieta mediterrânea é um padrão alimentar com base em alto consumo de cereais integrais, frutas e hortaliças *in natura*, nozes, castanhas e azeite de oliva extravirgem; consumo moderado de peixes, aves e vinho tinto; e baixa ingestão de produtos lácteos, carnes vermelhas, doces e ácidos graxos saturados.

Esse padrão alimentar tem sido relacionado a menor risco de desenvolvimento de DCV. Seu papel cardioprotetor é atribuído aos ácidos graxos monoinsaturados, aos polifenóis e aos ácidos graxos ômega-3 e 9, os quais atuam

por meio de mecanismos que envolvem interações entre genes e nutrientes.[103]

Um ensaio clínico randomizado, realizado na Espanha com adultos saudáveis, avaliou se os benefícios do consumo da dieta mediterrânea e do azeite de oliva extravirgem estavam relacionados a alterações na expressão de genes associados à aterosclerose. Os participantes foram separados em três grupos: dieta mediterrânea associada a azeite de oliva (328 mg/kg de polifenóis), dieta mediterrânea sem azeite de oliva (55 mg/kg de polifenóis) e dieta controle durante três meses. O primeiro grupo apresentou menor expressão de genes que codificam proteínas relacionadas com a resposta inflamatória e o estresse oxidativo: interleucina 7, interferon gama, proteínas ativadoras de GTPases (Rho GTPases), receptor beta-adrenérgico e polimerase kapa em células mononucleares de sangue periférico em relação aos demais indivíduos. Os autores concluíram que o consumo de azeite de oliva incorporado no padrão de dieta mediterrânea pode favorecer mecanismos antitrombóticos e antiaterogênicos por diminuir a expressão de genes pró-aterogênicos.[104]

Outro estudo avaliou 450 participantes adultos de ambos os sexos (± 54,5 anos de idade) da coorte LIPGENE (Espanha, França, Irlanda, Polônia, Noruega, Países Baixos, Reino Unido e Suécia), todos com síndrome metabólica. Os voluntários, separados em quatro grupos de intervenção alimentar, divididos de acordo com o padrão de lipídios (dieta padrão, alto teor de ácidos graxos saturados, alto teor de ácidos graxos monoinsaturados e suplementação com ômega-3), foram acompanhados por 12 semanas. A expressão do gene da óxido nítrico sintase endotelial (NOS3) foi significativamente menor após o período de intervenção entre os carreadores do alelo variante em relação ao polimorfismo Asp298Glu (rs1799983) no gene da NOS3. Esses indivíduos também apresentaram associação inversa entre o consumo de ômega-3 e as concentrações plasmáticas de TG. Os autores sugerem que esses indivíduos possam se beneficiar com a ingestão de ômega-3 para a redução das concentrações sanguíneas de TG.[105]

Gastaldi et al.[106] avaliaram a população do estudo de intervenção Medi-RIVAGE, em que 169 indivíduos foram submetidos a 3 meses de intervenção alimentar. Foram incluídos no estudo homens e mulheres franceses, de 22 a 70 anos, com risco cardiovascular moderado (apresentando hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, IMC elevado ou hipertensão). Os voluntários consumiram nesse período dieta com baixo teor de lipídios, seguindo o modelo da dieta mediterrânea ou das recomendações da American Heart Association. Foram avaliadas as interações entre o consumo alimentar e os polimorfismos Ala54Thr no gene da FABP2 e -493G/T no gene da proteína de transferência de TG microssomal (MTTP). Após o período de intervenção, os indivíduos homozigotos para a variante com relação ao SNP no gene da FABP2 apresentaram maiores reduções nas concentrações da APOB (em jejum) em comparação aos demais indivíduos. Em relação ao SNP no gene da MTTP, os indivíduos com genótipo TT apresentaram maior redução das concentrações plasmáticas de ácidos palmítico (16:0) e oleico (18:1) e aumento das concentrações plasmáticas de ácido linoleico (18:2). Apenas os homens carreadores TT apresentaram aumento das concentrações de ácido esteárico (18:0). Os indivíduos TT também apresentaram maiores variações nos parâmetros bioquímicos após a dieta (diminuição das concentrações de APOB48, colesterol total, TG e fosfolipídios ricos em TG). Nesse estudo, os homens homozigotos para a variante MTTP foram mais responsivos às modificações dietéticas, sugerindo ação específica por sexo. Os autores destacam que está descrita na literatura a associação entre o alelo T relativo ao gene da variante em relação ao gene *MTTP* e o aumento da expressão desse gene, bem como da produção de lipoproteínas contendo APOB48.

Considerando os aspectos abordados, nota-se que fatores relacionados à nutrigenômica e à nutrigenética agem concomitantemente para influenciar o perfil lipídico individual. Sendo assim, torna-se necessário o estudo simultâneo das duas ciências para que seja possível a compreensão acerca das interações entre o perfil genético, o consumo alimentar, o perfil lipídico individual e, consequentemente, dos riscos cardiovasculares.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os avanços em genômica nutricional têm direcionado a elaboração de recomendações nutricionais personalizadas visando à redução do risco e ao tratamento das DCV, bem como de seus fatores de risco. Os genes relacionados ao metabolismo lipídico vêm sendo amplamente explorados nas últimas duas décadas. Entretanto, a construção do conhecimento acerca da relação genes-nutrientes-ambiente é delicada e complexa. Os resultados de grandes estudos não podem ser extrapolados, uma vez que essa relação depende de fatores ambientais, como a própria alimentação, e das características de cada população.

Desse modo, muitos esforços ainda são necessários para que o cuidado individual personalizado seja alcançado, inclusive condução de novos GWAS, uma vez que a gama de genes e SNP envolvidos nos mecanismos das DCNT é extensa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control. Geneva: World Health Organization; 2011.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Taxa de mortalidade específica por doenças do aparelho circulatório. 2010. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?idb2010/c08.def>. Acesso em: 1 jul. 2014.
3. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz Brasileira de Prevenção Cardiovascular. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. 2013;101(6 supl.2):S1-S63.
4. Byrne MM, Murphy RT, Ryan AW. Epigenetic modulation in the treatment of atherosclerotic disease. Frontiers in Genetics. 2014;364(5):1-25.
5. Motta NAV, Fumian MM, Castro JP, Brito FCF. Inflamação e aterosclerose: novos biomarcadores e perspectivas terapêuticas. Revista Brasileira de Cardiologia. 2013;26(5):390-99.
6. Miller M, Stone NJ, Ballantyne C, Bittner V, Criqui MH, Ginsberg HN. Triglycerides and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association. Circulation. 2011;123(20):2292-333.
7. Katcher HI, Hill AM, Lanfor JL, Yoo JS, Kris-Etherton PM. Lifestyle approaches and dietary strategies to lower LDL-cholesterol and triglycerides and raise HDL-cholesterol. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America. 2009;38(1):45-78.
8. Arai H. Oxidative modification of lipoproteins. Sub-cell Biochemistry. 2014;77:103-114.
9. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis: the road ahead. Cell. 2001;104(4):503-16.
10. Wolf D, Stachon PC, Bode C, Zirlik A. Inflammatory mechanisms in atherosclerosis. Hamostaseologie. 2014;34:63-71.
11. Giribela CRG, Gengo R, Hong V, Consolim-Colombo FM. Função e disfunção endotelial: da fisiopatologia às perspectivas de uso em pesquisa e na prática clínica. Revista Brasileira de Hipertensão. 2011;18(1):27-32.
12. Liu Z, Han Y, Li L, Lu H, Meng J, Li X et al. The hydrogen sulfide donor, GYY4137, exhibits anti-atherosclerotic activity in high fat fed apolipoprotein E(-/-) mice. British Journal of Farmacology. 2013;169(8):1795-809.
13. Brewer HB. Clinical review: the evolving role of HDL in the treatment of high-risk patients with cardiovascular disease. Journal Clini-cal of Endcrinology and Metabolism. 2011;96(5):1246-57.
14. World Health Organization. Package of essential noncommunicable disease interventions for primary health care in low-resource settings. Geneva: World Health Organization; 2010.
15. World Health Organization. Prevention of cardiovascular disease. Geneva: World Health Organization; 2007.
16. Ross B. Personalised nutrition: ready for practice? Proceedings of the Nutrition Society. 2013;72(1):48-52.
17. Lovegrove JA, Gitau JR. Personalized nutrition for the prevention of cardiovascular disease: a future perspective. Journal of Human Nutrition and Dietetics. 2011;21:306-16.
18. Merched AJ, Chan L. Nutrigenetics and nutrigenomics of atherosclerosis. Current Atherosclerosis Reports. 2013;15(6):328.
19. Stenne R, Hurlimann TLLM, Godard B. Are research papers reporting results from nutrigenetics clinical research a potential source of biohype? Accountability in Research. 2012;19(5):285-307.
20. Corella D, Ordovas JM. Single Nucleotide Polymorphisms that influence lipid metabolism: Interaction with Dietary Factors. Annu Rev Nutr. 2005;25:341-90.
21. Rubin D, Helwig U, Pfeuffer M, Ainger A, Ruether A, Matusch D et al. The effect of FABP2 promoter haplotype on response to a diet with medium-chain triacylglycerols. Genes and Nutrition. 2012;7:437-45.
22. Martínez-López E, Ruíz-Madrigal B, Hernández-Cañaveral I, Panduro A. Association of the T54 allele of the FABP2 gene with cardi-ovascular risk factors in obese Mexican subjects. Diabetes and Vascular Disease Research. 2007;4(3):235-36.
23. Martínez-López E, Maritza AB, Garcia-Garcia RBS, Jorge M, Gonzalez-Avalos BS, Maldonado-Gonzalez M. Effect of Ala-54Thr polymorphism of FABP2 on anthropometric and biochemical variables in response to a moderate-fat diet. Nutrition. 2013;29:46-51.
24. Gomez LC, Sebastián MR, Ojeda MS, Gimenez S, Mayorga LS, Roqué M. Polymorphism of the FABP2 gene: a population frequency analysis and an association study with cardiovascular risk markers in Argentina. BMC Medical Genetics. 2007;8(39):1-7.
25. De Luis DA, Gonzalez SM, Aller R, Izaola O, Conde R., De La Fuente B. Influence of Ala54Thr polymorphism of fatty acid-binding protein 2 on insulin resistance and adipocytokines in patients with diabetes mellitus type 2. European Review for Medical and Pharma-cological Sciences. 2010;14(2):89-95.
26. Gao F, Ihn HE, Medina MW, Krauss RM. A common polymorphism in the LDL receptor gene has multiple effects on LDL receptor function. Human Molecular Genetics. 2013;22(7):1424-31.
27. Brown MS, Goldstein JS. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Nobel Lectures. 1995;284-324.
28. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. 2012;99(2 sup. 2):1-30.
29. Zhu H, Tucker HM, Grear KE, Simpson JF, Manning AK, Cupples LA et al. A common polymorphism decreases low-density lipoprotein receptor exon 12 splicing efficiency and associates with increased cholesterol. Human Molecular Genetics. 2007;16(14):1765-72.
30. Andreotti G, Menashe I, Chen J, Chang SC, Rashid A, Gao YT et al. Genetic determinants of serum lipid levels in Chinese subjects: A population-based study in Shanghai, China. European Journal of Epidemology. 2009;24(12):763-74.
31. Franceschini N, Muallem H, Rose KM, Boerwinkle E, Maeda N. LDL receptor polymorphisms and the risk of coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2009;7(3):496-98.
32. Li Y, He PP, Zhang DW, Zheng XL, Cayabyab FS, Yin WD et al. Lipoprotein lipase: from gene to atherosclerosis. Atherosclerosis. 2014;237:597-608.
33. Baik I, Lee SK, Kim SH, Shin C. A lipoprotein lipase gene polymorphism interacts with consumption of alcohol and unsaturated fat to modulate serum HDL-cholesterol concentrations. The Journal of Nutrition. 2013;143:1618-25.
34. Nettleton JA, Steffen LM, Ballantyne CM, Boerwinkle E, Folsom AR. Associations between HDL-cholesterol and polymorphisms in hepatic lipase and lipoprotein lipase genes are modified by dietary fat intake in African American and White Adults. Atherosclerosis. 2007;194(2):e131-e140.
35. Waterworth DM, Ricketts SL, Song K, Chen L, Zhao JH, Ripatti S et al. Genetic variants influencing circulating lipid levels and risk of coronary artery disease. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology. 2010;30(11):2264-76.
36. Hu M, Li Z, Fang DZ. A high-carbohydrate diet effects on the A allele of hepatic lipase polymorphism on the APOB100/APOAI ra-

tio in young chinese males. Advances in Clinical and Experimental Medicine. 2012;21(6):751-57.
37. Ordovas JM, Corella D, Cupples LA, Demissie S, Kelleher A, Coltell O et al. Polyunsaturated fatty acids modulate the effects of the APOA1 G-A polymorphism on HDL-cholesterol concentrations in a sex-specific manner: the Framingham Study. The American Journal of Clinical Nutrition. 2002;75:38-46.
38. Agrawal S, Mastana S. Genetics of coronary heart disease with reference to APOAI-CII-AIV gene region. World Journal of Cardiology. 2014;6(8):755-63.
39. Rudkowska I, Dewailly E, Hegele RA, Boiteau V, Dubé-Linteau A, Abdous B et al. Gene-diet interactions on plasma lipid levels in the Inuit population. British Journal of Nutrition. 2013;109:953-61.
40. Andrade FM, Bulhões AC, Maluf SW, Schuch JB, Voigt F, Lucatelli JF et al. The influence of nutrigenetics on the lipid profile: inte-ractions between genes and dietary habits. Biochemical Genetics. 2010;48(3-4):342-55.
41. Wang Q, Zhou SB, Wang LJ, Lei MM, Wang Y, Miao C et al. Seven functional polymorphisms in the CETP gene and myocardial infarction risk: a meta-analysis and meta-regression. PLoS One. 2014;9(12):887-95.
42. Ridker PM, Paré G, Parker AN, Zee RY, Miletich JP, Chasman DI. Polymorphism in the CETP gene region, HDL cholesterol, and risk of future myocardial infarction: Genomewide analysis among 18 245 initially healthy women from the Women's Genome Health Study. Circulation Cardiovascular Genetics. 2009;2(1):26-33.
43. Gammon CS, Minihane AM, Kruger R, Conlon CA, von Hurst PR, Jones B, Stonehouse W. TaqIB polymorphism in the cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene influences lipid responses to the consumption of kiwifruit in hypercholesterolaemic men. British Journal of Nutrition. 2014;111(6):1077-84.
44. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. Nature. 1990;343(6257):425-30.
45. Akadam-Teker B, Kurnaz O, Coskunpinar E, Daglar-Aday A, Kucukhuseyin O, Cakmak HA et al. The effects of age and gender on the relationship between HMGCR promoter-911 SNP (rs33761740) and serum lipids in patients with coronary heart disease. GENE. 2013;528(2):93-98.
46. Swerdlow et al. HMG-coenzyme A reductase inhibition, type 2 diabetes, and bodyweight: evidence from genetic analysis and rando-mised trials. Lancet. 2015;385(9965):351-61.
47. Freitas RN, Khaw KT, Wu K, Bowman R, Jeffery H, Luben R et al. A HMGCR polymorphism is associated with relations between blood pressure and urinary sodium and potassium ratio in the Epic-Norfolk Study. Journal of American Society of Hypertension. 2009;3(4):238-44.
48. Fitzgerald ML, Mujawar Z, Tamehiro N. ABC transporters, atherosclerosis and inflammation. Atherosclerosis. 2010;211(2):361-70.
49. Jakulj L, Vissers MN, Tanck MW, Hutten BA, Stellaard F, Kastelein JJ et al. ABCG5/G8 polymorphisms and markers of cholesterol metabolism: systematic review and meta-analysis. Journal of Lipid Research. 2010;51(10):3016-23.
50. Sarkadi B, Homolya L, Szakács G, Váradi A. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system. Physiol Rev. 2006;86(4):1179-236.
51. Hubacek JA, Berge KE, Stefková J, Pitha J, Skodová Z, Lánská V et al. Polymorphisms in ABCG5 and ABCG8 transporters and plasma cholesterol levels. Physiological Research. 2004;53(4):395-401.
52. Chen ZC, Shin SJ, Kuo KK, Lin KD, Yu ML, Hsiao PJ. Significant association of ABCG8:D19H gene polymorphism with hypercho-lesterolemia and insulin resistance. Journal of Human Genetics. 2008;53(8):757-63.
53. Gylling H, Hallikainen M, Pihlajamäki J, Agren J, Laakso M, Rajaratnam RA et al. Polymorphisms in the ABCG5 and ABCG8 genes associate with cholesterol absorption and insulin sensitivity. Journal of Lipid Research. 2004;45(9):1660-65.
54. Herron KL, McGrane MM, Waters D, Lofgren IE, Clark RM, Ordovas JM et al. The ABCG5 polymorphism contributes to individual responses to dietary cholesterol and carotenoids in eggs. Journal of Nutrition. 2006;136(5):1161-65.
55. Mason RR, Mokhtar R, Matzaris M, Selathurai A, Kowalski GM, Mokbel N et al. PLIN5 deletion remodels intracellular lipid compo-sition and causes insulin resistance in muscle. Molecular Genetics and Metabolism. 2014;14(3):652-63.
56. Langhi C, Marquart TJ, Allen RM, Baldán A. Perilipin-5 is regulated by statins and controls triglyceride contents in the hepatocyte. Journal of Hepatology. 2014;61(2):358-65.
57. Perez-Martinez P, Yiannakouris N, Lopez-Miranda J, Arnett D, Tsai M, Galan E et al. Postprandial triacylglycerol metabolism is mo-dified by the presence of genetic variation at the perilipin (PLIN) locus in 2 white populations. American Journal of Clinical Nutrition. 2008;87(3):744-52.
58. Duan X, Zhu W, Li Y, Zhang Z, Zhao Y, Dao J et al. The effect of sterol regulatory element-binding protein 2 polymorphism on the serum lipid in northern Chinese subjects. Journal of Lipid Research. 2005;46:252-57.
59. Robinet P, Védie B, Chironi G, Gariépy J, Simon A, Moatti N et al. Characterization of polymorphic structure of SREBP-2 gene: role in atherosclerosis. Atherosclerosis. 2003;168:381-87.
60. Fan YM, Karhunen PJ, Levula M, Ilveskoski E, Mikkelsson J, Kajander OA et al. Expression of sterol regulatory element-binding transcription factor (SREBF) 2 and SREBF cleavage-activating protein (SCAP) in human atheroma and the association of their allelic variants with sudden cardiac death. Thrombosis Journal. 2008;6(17).
61. Védie B, Jeunemaitre X, Mégnien JL, Atger V, Simon A, Moatti N. A new DNA polymorphism in the 5% untranslated region of the human SREBP-1a is related to development of atherosclerosis in high cardiovascular risk population. Atherosclerosis. 2001;154:589-97.
62. Laaksonen R, Thelen KM, Päivä H, Matinheikki J, Vesalainen R, Janatuinen T et al. Genetic variant of the SREBF-1 gene is significantly related to cholesterol synthesis in man. Atherosclerosis. 2006;185:206-09.
63. Zhang Z, Gong RR, Du R, Xiao LY, Duan W, Zhou XD et al. Associations of the SREBP-1c gene polymorphism with gender-specific changes in serum lipids induced by a high-carbohydrate diet in healthy Chinese youth. Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism. 2011;36(2):226-32.
64. Sertznig P, Seifert M, Tilgen W, Reichrath J. Present concepts and future outlook: function of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) for pathogenesis, progression, and therapy of cancer. Journal of Cellular Physiology. 2007;212(1):1-12.
65. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. Annual Review of Medicine. 2002;53:409-35.
66. Grygiel-Górniak B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications: a review. Nutrition Journal. 2014;13(17):1186-92.
67. Xie HJ, Hai B, Wu M, Chen Q, Liu MM, Dong C et al. Analysis on the association between PPAR α/γ polymorphisms and

lipoprotein(a) in a Chinese Han population. Molecular Genetics and Genomics. 2014;289(5):981-87.
68. Mazzotti DR, Singulane CC, Ota VK, Rodrigues TP, Furuya TK, De Souza FJ et al. PPARα polymorphisms as risk factors for dyslipidemia in a Brazilian population. Molecular Genetics and Metabolism. 2011;102(2):189-93.
69. Yen CJ, Beamer BA, Negri C, Silver K, Brown KA, Yarnall DP et al. Molecular scanning of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma (hPPAR gamma) gene in diabetic Caucasians: identification of a Pro12Ala PPAR gamma 2 missense mutation. Biochemical and Biophysical Research Communication. 1997;241(2):270-74.
70. Rosado EL, Bressan J, Martins MF, Cecon PR, Martinez JA. Polymorphism in the PPARgamma2 and beta2-adrenergic genes and diet lipid effects on body composition, energy expenditure and eating behavior of obese women. Appetite. 2007;49:635-43.
71. Lee BC, Lee H, Chung HO. Polymorphism is associated with reduced risk for ischemic stroke with type 2 diabetes. Neuroscience Letters. 2006;410(2):141-45.
72. Chhabra S, Narang S, Lakshmy R, Das N. APO A1-75 G to A substitution associated with severe forms of CAD, lower levels of HDL and APOA-I among Northern Indians. 2005;21(4):169-74.
73. Delgado-Lista J, Perez-Jimenez F, Ruano J, Perez-Martinez P, Fuentes F, Criado-Garcia J et al. Effects of variations in the APOA1/C3/A4/A5 gene cluster on different parameters of postprandial lipid metabolism in healthy young men. The Journal of Lipid Research. 2010;51(1):63-73.
74. Lai CQ, Parnell L, Ordovas JM. The APOA1/C3/A4/A5 gene cluster, lipid metabolism and cardiovascular disease risk. Current Opi-nion in Lipidology. 2005;16:153-166.
75. Dodani S, Henkhaus R, Dong L, Butler MG. Apo lipoprotein A1 gene polymorphisms predict cardio-metabolic risk in South Asian immigrants. Disease Markers. 2012;32:9-19.
76. Song YY, Gong RR, Zhang Z, Li YH, Xiao LY, Zhou XD et al. A high-carbohydrate diet enhances the adverse effect of the S2 allele of APOC3 SstI polymorphism on the TG/HDL-C ratio only in young Chinese females. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 2011;44(6):524-30.
77. Huang MC, Wang TN, Liu YL, Pa TH, Tu HP, Huang YC et al. Effect of SstI polymorphism of the apolipoprotein CIII gene and environmental factors on risks of hypertriglyceridemia in Taiwan aborigines. Circulation Journal. 2006;70:1030-36.
78. Russo GT, Meigs JB, Cupples LA, Demissie S, Otvos JD, Wilson PW et al. Association of the Sst-I polymorphism at the APOC3 gene locus with variations in lipid levels, lipoprotein subclass profiles and coronary heart disease risk: the Framingham offspring study. Atherosclerosis. 2001;158(1):173-81.
79. Rudkowska I, Ouellette C, Dewailly E, Hegele RA, Boiteau V, Dubé-Linteau A et al. Omega-3 fatty acids, polymorphisms and lipid related cardiovascular disease risk factors in the Inuit population. Nutrition & Metabolism. 2013;10(26).
80. Canales A, Benedi J, Bastida S, Corella D, Guillen M, Librelotto J et al. The effect of consuming meat enriched in walnut paste on platelet aggregation and thrombogenesis varies in volunteers with different apolipoprotein A4 genotype. Nutrición Hospitalaria. 2010;25(5):746-54.
81. Andrade FM, Maluf SW, Schuch JB, Voigt F, Barros AC, Lucatelli JF et al. The influence of the S19W SNP of the APOA5 gene on triglyceride levels in southern Brazil: Interactions with the APOE gene, sex and menopause status. Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases. 2011;21:584-90.
82. Lai CQ, Corella D, Demissie S, Cupples A, Adiconis X, Zhu Y et al. Dietary intake of n-6 fatty acids modulates effect of apolipoprotein A5 gene on plasma fasting triglycerides, remnant lipoprotein concentrations, and lipoprotein particle size - The Framingham Heart Study. Circulation. 2006;113:2062-70.
83. Moreno-Luna R, Perez-Jimenez F, Marin C, Perez-Martinez P, Gomez P, Jimenez-Gomez Y et al. Two independent apolipoprotein A5 haplotypes modulate postprandial lipoprotein metabolism in a healthy caucasian population. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 2007;92(6):2280-85.
84. Chen SN, Cilingiroglu M, Todd J, Lombardi R, Willerson JT, Gotto-Junior AM et al. Candidate genetic analysis of plasma high-density lipoprotein-cholesterol and severity of coronary atherosclerosis. BMC Medical Genetics. 2009;10;111-19.
85. Kang S, Kyung C, Park JS, Kim S, Lee SP, Kim MK et al. Subclinical vascular inflammation in subjects with normal weight obesity and its association with body fat: an F-FDG-PET/CT study. Cardiovacular Diabetology. 2014;13(70):1-12.
86. Mattei J, Demissie S, Tucker KL, Ordovas JM. Apolipoprotein A5 polymorphisms interact with total dietary fat intake in association with markers of metabolic syndrome in Puerto Rican older adults. The Journal of Nutrition. 2009;139:2301-08.
87. Sánchez-Moreno C, Ordovás JM, Smith CE, Baraza JC, Lee YC, Garaulet M. APOA5 gene variation interacts with dietary fat intake to modulate obesity and circulating triglycerides in a Mediterranean population. J Nutr. 2011;141(3):380-5.
88. Hubacek JA, Peasey A, Rubinova R, Pikhart H, Bobak M. The association between APOA5 haplotypes and plasma lipids is not modified by energy or fat intake: The Czech HAPIEE study. Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases. 2014;24:243-47.
89. Paula RS, Souza VC, Benedet AL, Souza ER, Toledo JO, Moraes CF et al. Dietary fat and apolipoprotein genotypes modulate plasma lipoprotein levels in Brazilian elderly women. Molecular and Cellular Biochemistry. 2010;337(1-2):307-15.
90. Corella D, Peloso G, Arnett DK, Demissie S, Cupples LA, Tucker K et al. APOA2, dietary fat and body mass index: replication of a gene-diet interaction in three independent populations. Archives of Internal Medicine. 2009;169(20):1897-906.
91. Delgado-Lista J, Perez-Jimenez F, Tanaka T, Perez-Martinez P, Jimenez-Gomez Y, Marin C et al. An apolipoprotein A-II polymorphism (-265T/C, rs5082) regulates postprandial response to a saturated fat overload in healthy men. The Journal of Nutrition. 2007;137:2024-28.
92. Hooft FMV, Ruotolo G, Boquist S, Faire U, Eggertsein G, Hamsten A. Human evidence that the apolipoprotein A-II gene is implicated in visceral fat accumulation and metabolism of triglyceride-rich lipoproteins. Circulation. 2001;104:1223-28.
93. Kim GH, Ryan JJ, Archer SL. The role of redox signaling in epigenetics and cardiovascular disease. Antioxidants and Redox Signalling. 2013;18(15):1920-36.
94. Phillips CM. Nutrigenetics and metabolic disease: current status and implications for personalised nutrition. Nutrients. 2013;5: 32-57.
95. Lye SH, Chahil JK, Bagali P, Alex L, Vadivelu J, Azman W et al. Genetic polymorphisms in LDLR, APOB, PCSK9 and other lipid related genes associated with familial hypercholesterolemia in Malaysia. Plos One. 2013;8(4).
96. Garcia-Rios A, Delgado-Lista J, Alcala-Diaz JF, Lopez-Miranda J, Perez-Martinez P. Nutraceuticals and coronary heart disease. Curr Opin Cardiol. 2013;28(4):475-82.

97. Carvalho-Wells AL, Jackson KG, Lockyer S, Lovegrove JA, Minihane AM. APOE genotype influences triglyceride and C-reactive pro-tein responses to altered dietary fat intake in UK adults. The American Journal of Clinical Nutrition. 2012;96:1447-53.
98. Minihane AM, Jofre-Monseny L, Olano-Martin E, Rimbach G. ApoE genotype, cardiovascular risk and responsiveness to dietary fat manipulation. Proceedings of the Nutrition Society. 2007;66: 183-97.
99. Lovegrove JA, Gitau JR. Nutrigenetics and CVD: what does the future hold? Proceedings of the Nutrition Society. 2008;67:206-13.
100. Erkkilä AT, Sarkkinen ES, Lindi V, Lehto S, Laakso M, Uusitupa MIJ. APOE polymorphism and the hypertriglyceridemic effect of dietary sucrose. The American Journal of Clinical Nutrition. 2001;73:746-52.
101. Bouchard-Mercier A, Rudkowska I, Lemieux S, Couture P, Vohl MC. Polymorphisms in genes involved in fatty acid β-oxidation interact with dietary fat intakes to modulate the plasma TG response to a fish oil supplementation. Nutrients. 2014;6(3):1145-63.
102. Corella D, Ordovás JM. Aging and cardiovascular diseases: the role of gene-diet interactions. Ageing Res Rev. 2014;18:53-73.
103. Capurso C, Massaro M, Scoditti E, Vendemiale G, Capurso A. Vascular effects of the Mediterranean diet part I: anti-hypertensive and anti-thrombotic effects. Vascular Pharmacology. 2014;63(3): 118-26.
104. Konstantinidou V, Covas MI, Muñoz-Aguayo D, Khymenets O, De La Torre R, Saez G et al. In vivo nutrigenomic effects of virgin olive oil polyphenols within the frame of the Mediterranean diet: a randomized controlled trial. Faseb Journal. 2010;24(7):2546-57.
105. Ferguson JF, Phillips CM, McMonagle J, Pérez-Martínez P, Shaw DI, Lovegrove JA et al. NOS3 gene polymorphisms are associated with risk markers of cardiovascular disease, and interact with omega-3 polyunsaturated fatty acids. Atherosclerosis. 2010;2:539-44.
106. Gastaldi M, Dizière S, Defoort C, Portugal H, Lairon D, Darmon M et al. Sex-specific association of fatty acid binding protein 2 and microsomal triacylglycerol transfer protein variants with response to dietary lipid changes in the 3-mo Medi-RIVAGE primary intervention study. The American Journal of Clinical Nutrition. 2007;86:1633-41.

24 Doenças cardiovasculares: enfoque no metabolismo da homocisteína

Carla Cristina de Morais
Lana Pacheco Franco
Marcelo Macedo Rogero
Maria Aderuza Horst
Cristiane Cominetti

INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que as doenças cardiovasculares (DCV) – doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) responsáveis pelo maior número de mortes no mundo – responderão por 22,2 milhões de óbitos em 2030.[1] Segundo o último registro do Ministério da Saúde, no Brasil, as DCV foram responsáveis por 30,9% das mortes em 2011.[2]

A eficácia de intervenções preventivas e do tratamento depende do controle dos fatores de risco, normalmente classificados em modificáveis e não modificáveis. Os primeiros incluem dislipidemias, hiper-homocisteinemia, diabete melito, excesso de peso, hipertensão arterial, hábitos alimentares inadequados e sedentarismo, além de outras alterações metabólicas. Os fatores de risco não modificáveis compreendem idade, sexo e herança genética.[3]

A hiper-homocisteinemia é considerada um biomarcador e fator de risco independente para as DCV. Em altas concentrações sanguíneas, a homocisteína é um fator promotor do aumento do estresse oxidativo e do risco de dano endotelial. O aumento do estresse oxidativo é ponto fundamental nos mecanismos de desenvolvimento das DCV. Na hiper-homocisteinemia, o potencial antioxidante das células endoteliais é reduzido, provavelmente em razão da menor expressão e atividade de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase extracelular e a glutationa peroxidase.[4] Além disso, a oxidação da homocisteína gera espécies reativas de oxigênio (ERO) que causam danos endoteliais, favorecendo os eventos tromboembólicos.[4,5]

Os produtos da oxidação da homocisteína também contribuem para a redução da biodisponibilidade de mediadores vasoativos como a endotelina-1, o óxido nítrico e a prostaciclina I2 (PGI2).[6] A homocisteína induz, ainda, por meio da ativação do fator nuclear kappa B (NF-kB), a expressão da interleucina 8 (IL-8) e da proteína quimiotática de monócitos (MCP-1), envolvidas no processo aterogênico por atuarem na quimiotaxia de leucócitos.[7]

As células endoteliais não expressam a enzima cistationina beta-sintetase (CBS), necessária na via de transulfuração. Desse modo, pequenos aumentos nas concentrações de homocisteína afetam o endotélio vascular. *In vitro*, a hiper-homocisteinemia apresenta efeito pró-coagulante ao inibir a ativação da proteína C reativa (PCR) e a expressão da trombomodulina na superfície do endotélio celular. Além disso, em altas concentrações de homocisteína, há geração de peróxido de hidrogênio, que reduz a ligação de antitrombina III às células endoteliais, o que favorece a formação de trombos.[8]

Na hiper-homocisteinemia, parte da homocisteína é convertida em homocisteína tiolactona, que pode danificar ou até mesmo causar a perda da função de proteínas do endotélio vascular, além de induzir a resposta imune. A ligação da homocisteína com albumina, hemoglobina, fibrinogênio, lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de alta densidade (HDL) e outras proteínas circulantes promove a modificação conformacional dessas proteínas. O fibrinogênio torna-se mais permeável e resistente à fibrinólise, e as partículas de LDL, mais suscetíveis à oxidação, favorecendo a formação de trombos.[9]

Ainda que sejam necessários muitos estudos para elucidar o papel da hiper-homocisteinemia na fisiopatologia das DCV, a literatura já estabelece a relevância do controle das concentrações de homocisteína nessas doenças. Nesse contexto, a compreensão de fatores genéticos relacionados ao metabolismo da homocisteína

poderá indicar o início do caminho para as melhores estratégias de prevenção e tratamentos personalizados das DCV.[10]

Dessa forma, este capítulo apresenta um panorama geral dos aspectos que relacionam as DCV com a nutrigenética, a nutrigenômica e a epigenética, com enfoque na hiper-homocisteinemia. Para tanto, é importante a compreensão do metabolismo da homocisteína no organismo humano.

METABOLISMO DA HOMOCISTEÍNA

A associação entre concentrações de homocisteína e desenvolvimento de DCV é reconhecida na literatura. Uma metanálise indicou que um aumento de 5 mcmol/L nas concentrações de homocisteína eleva em 20% o risco de desenvolvimento de eventos cardíacos, independentemente dos outros fatores de risco para DCV em indivíduos sem diagnóstico prévio.[11] Justifica-se, assim, a necessidade de compreender o metabolismo da homocisteína e as causas da hiper-homocisteinemia para a instituição de tratamentos eficazes.

A homocisteína, uma pequena substância sulfidrílica análoga ao aminoácido cisteína, com peso molecular de 135,18 g/mol, é o ponto de encontro para duas vias metabólicas do ciclo da metionina (Figura 24.1). A via da remetilação resulta em produção de metionina e a via da transulfuração produz cisteína. A metionina, proveniente da alimentação, é convertida em homocisteína (via de desmetilação). Esta se liga à serina para produzir cistationina em um processo catalisado pela enzima CBS, cujo cofator é a vitamina B_6. A enzima gama-cistationase hidrolisa a cistationina em cisteína, com liberação de alfa-cetobutirato; esta é a via da transulfuração.[12]

A homocisteína converte-se em metionina ao receber um grupo metil da molécula de 5-metiltetra-hidrofolato. Essa etapa enzimática é catalisada pela enzima 5-metiltetra-hidrofolato homocisteína metil transferase (ou metionina sintetase – MS), sendo a vitamina B12 seu cofator. O ciclo do folato encontra-se com o ciclo da metionina nessa doação do grupo metil, em que a enzima metileno tetra-hidrofolato redutase (MTHFR) catalisa a conversão do 5-10 metiltetra-hidrofolato em 5-metiltetra-hidrofolato. Alternativamente, o grupo metil pode ser doado pela betaína.[13]

Os fatores genéticos (sobretudo os genes que codificam enzimas do metabolismo da metionina e da cisteína), as deficiências nutricionais (ácido fólico, cobalamina e piridoxina), o decréscimo da função renal ou, ainda, a combinação desses itens são considerados fatores causais para a hiper-homocisteinemia plasmática.[14] Assim, caso haja alterações em genes envolvidos no metabolismo da homocisteína ou déficit de vitaminas do complexo B que atuam como cofatores nas vias de remetilação e/ou na via de transulfuração, o organismo pode responder com hiper-homocisteinemia.[15]

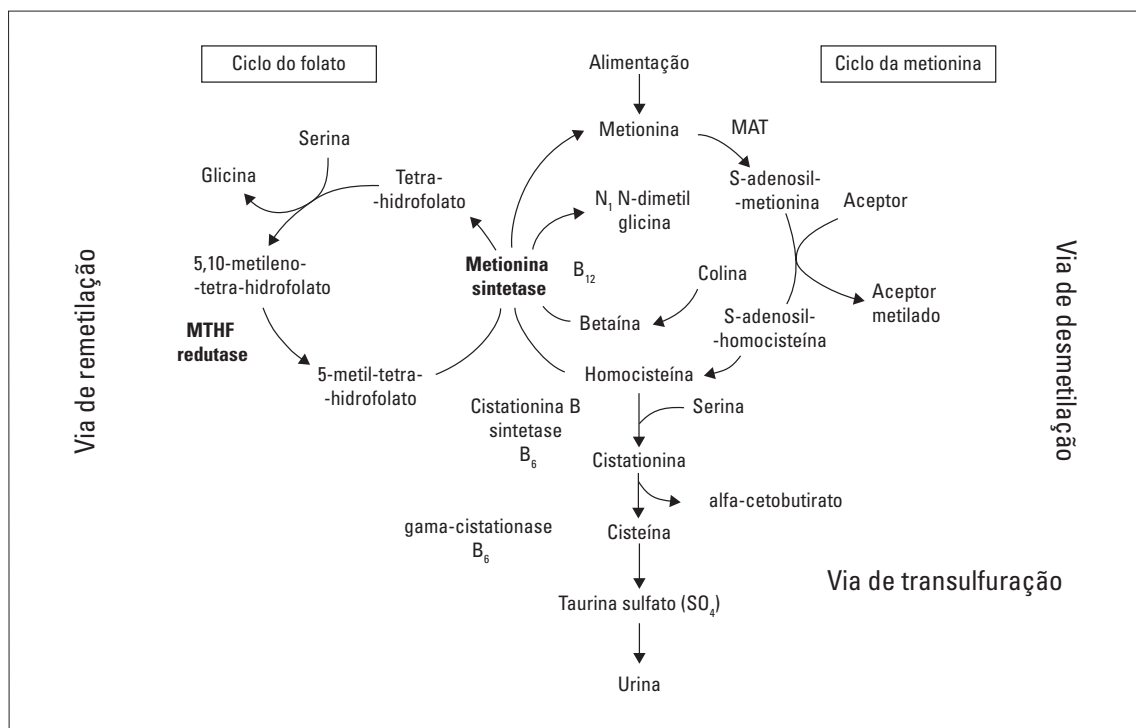



Figura 24.1 Metabolismo da homocisteína. B_6: vitamina B_6; B_{12}: vitamina B_{12}; MAT: metionina adenosiltransferase; MTHF redutase: metileno tetra-hidrofolato redutase. **Fonte:** adaptada de Chen et al.[12]

A relação entre as concentrações sanguíneas de homocisteína e o desenvolvimento das DCV já é extensamente descrita na literatura. A hiper-homocisteinemia é considerada fator promotor do aumento do estresse oxidativo e do risco de dano endotelial. Desse modo, a hiper-homocisteinemia é considerada um fator de risco independente para DCV. Entretanto, os mecanismos envolvidos permanecem pouco elucidados.[16]

POLIMORFISMOS RELACIONADOS COM O METABOLISMO DA HOMOCISTEÍNA

Variações genéticas podem implicar alteração nas enzimas envolvidas no metabolismo da homocisteína. Polimorfismos no gene da CBS estão associados a quadros de hiper-homocisteinemia grave e de homocistinúria. Erros inatos na síntese e/ou no transporte da metilcobalamina podem acarretar atividade reduzida da MS, associada também a hiper-homocisteinemia grave. Entretanto, a frequência dessas alterações é baixa. Polimorfismos no gene da enzima MTHFR apresentam maior prevalência. Em contrapartida, o efeito da redução na atividade enzimática sobre as concentrações sanguíneas de homocisteína é moderado.[14]

Uma metanálise com objetivo de investigar a relação do polimorfismo T833C/844ins68 (rs72058776) no gene da CBS com o risco de acidente vascular encefálico (AVE) incluiu nove estudos com chineses e um estudo com poloneses. Foram avaliados 2.247 casos e 1.813 controles. Os resultados indicaram associação significativa entre o polimorfismo e o risco de AVE ao comparar indivíduos carreadores do alelo variante com homozigotos selvagens (OR = 1,57; IC = 1,02-2,41, p = 0,039); indivíduos homozigotos para a variante com homozigotos selvagens (OR = 1,79; IC 95% = 1,14-2,82, p = 0,012) e indivíduos heterozigotos com homozigotos selvagens (OR = 1,56; IC 95% = 1,01-2,40, p = 0,044). O alelo variante 833C associou-se com maior risco para AVE.[17]

Um estudo caso-controle realizado no Cazaquistão avaliou a relação entre o polimorfismo T833C/844ins68 no gene da CBS com a hipertensão arterial primária. Foram investigados 545 casos (49,2 ± 7,6 anos de idade) e 500 controles (49,9 ± 10,0 anos de idade). Não houve diferença significativa da frequência alélica e distribuição genotípica entre os hipertensos e os controles. O polimorfismo estudado não foi associado com as concentrações plasmáticas de homocisteína. A análise de regressão linear múltipla apontou as concentrações séricas de colesterol total, as concentrações plasmáticas de homocisteína, o IMC, o tabagismo e a história familiar de hipertensão arterial como fatores de risco independente para a hipertensão na população estudada.[18]

O polimorfismo C677T no gene da MTHFR, no contexto do metabolismo da homocisteína, tem sido o mais amplamente investigado e relacionado com o aumento do risco cardiovascular.[19] A presença do alelo variante resulta em uma enzima mais termolábil, com menor atividade (cerca de 65% da atividade nos indivíduos heterozigotos e de 30% nos indivíduos homozigotos para a variante), e tem sido relacionada à elevação das concentrações plasmáticas de homocisteína e à redução do ácido fólico plasmático.[20] Uma metanálise que teve por objetivo avaliar a relação entre prevalência do alelo variante para esse polimorfismo e DCV revelou que indivíduos homozigotos para o alelo variante apresentaram chance 21% maior de desenvolver doença isquêmica do miocárdio.[21]

Um estudo descreveu a frequência dos polimorfismos *CBS* 844ins68, *MTHFR* C677T e A1298C em 85 pacientes brasileiros (65 mulheres e 20 homens) com diagnóstico de trombose e a relação com as concentrações plasmáticas de homocisteína. A frequência do alelo variante para os polimorfismos *CBS* 844ins68, *MTHFR* C677T e A1298C foi de 0,18, 0,27 e 0,26, respectivamente. As concentrações de homocisteína foram positivamente correlacionadas com a trombose recorrente. Em análise isolada, não houve correlação significativa dos polimorfismos com as concentrações de homocisteína. No entanto, ao examinar os três polimorfismos conjuntamente por análise de variância multivariada, encontrou-se correlação positiva e estatisticamente significativa com as concentrações de homocisteína.[22]

Uma investigação do tipo caso-controle com brasileiros adultos avaliou a relação entre os polimorfismos C677T e A1298C no gene da MTHFR e a presença, extensão e gravidade da doença arterial coronariana (DAC). Em relação ao polimorfismo C677T, a frequência do alelo variante foi de 0,38 (n = 67) no grupo de casos e 0,37 (n = 40) no grupo controle. Para o alelo variante 1298C, a frequência foi de 0,22 (n = 39) nos casos e 0,27 (n = 29) no grupo controle. Não foi encontrada associação entre esses polimorfismos e presença, extensão ou gravidade da DAC.[23]

Um estudo transversal incluindo 115 adolescentes brasileiros com fatores de risco cardiovascular (excesso de peso e/ou dislipidemias) avaliou a relação entre o perfil genético de acordo com os polimorfismos A1298C e C677T no gene da MTHFR, homocisteína plasmática, vitaminas do complexo B e perfil lipídico. A prevalência de hiper-homocisteinemia observada foi de 19,1% e os adolescentes carreadores do alelo variante do polimorfismo C677T apresentaram maiores concentrações plasmáticas de LDL-ox ($p < 0,01$) e de vitamina B_6 ($p < 0,02$). O aumento da vitamina B_6 pode estar associado a outros

polimorfismos, como aqueles no gene da enzima CBS (rs5742905 e rs rs234706).[24]

O conhecimento do perfil genético individual pode ser importante para a redução do risco e para o tratamento da hiper-homocisteinemia, uma vez que indivíduos carreadores dos alelos variantes em relação aos polimorfismos já descritos parecem apresentar necessidades aumentadas de ácido fólico e das vitaminas B_6 e B_{12}. É bem documentado que indivíduos com consumo adequado de ácido fólico não apresentam hiper-homocisteinemia ou apresentam o tipo moderado. Assim, ao identificar esses polimorfismos, é possível realizar planejamento nutricional individualizado.[25] Por outro lado, a eficácia da suplementação com altas doses dessas vitaminas com vistas à redução do risco cardiovascular ainda é controversa.[26-28] Desse modo, a suplementação deve considerar o estado nutricional em relação a essas vitaminas e o estímulo ao consumo de alimentos fonte desses micronutrientes.[29]

Um estudo randomizado avaliou o papel do polimorfismo C677T no gene da MTHFR na resposta à suplementação de ácido fólico sobre as concentrações de folato nos eritrócitos e no soro. Os indivíduos, americanos afrodescendentes de ambos os sexos com idade entre 28 a 69 anos, foram randomizados em três grupos (0, 200 e 400 mcg de ácido fólico durante 12 semanas). A concentração de folato nos eritrócitos aumentou apenas com a maior dosagem de suplementação de ácido fólico. Já as concentrações séricas de folato foram sensíveis à menor dose de ácido fólico suplementado. Não houve diferença do resultado da suplementação entre os genótipos.[30] Um estudo com suplementação de ácido fólico em adultos chineses hipertensos, por outro lado, revelou que os indivíduos com o genótipo TT apresentaram maior redução nas concentrações plasmáticas de homocisteína em relação aos heterozigotos ou homozigotos selvagens nos dois grupos suplementados. As dosagens de suplementação diárias foram de 0, 0,4 e 0,8 mg de ácido fólico combinado a tratamento com enalapril para os três grupos durante 8 semanas.[31]

Ordovas e Corella[32] sugerem que, apesar das evidências científicas ainda serem insuficientes para um aconselhamento nutricional com base na individualidade genética, já é consenso que diversos polimorfismos são capazes de modular a resposta à alimentação e interferir no metabolismo lipídico e no risco cardiovascular.

EPIGENÉTICA E DOENÇAS CARDIOVASCULARES

Além de o ácido fólico estar relacionado com o processo de síntese do DNA, apresenta papel fundamental nos mecanismos epigenéticos de metilação do DNA. Assim, alterações nas concentrações dessa vitamina podem interferir nos processos de estabilidade e integridade do material genético, na proliferação celular e na expressão gênica.[33]

A elucidação dos mecanismos epigenéticos na regulação da expressão gênica tem alterado a compreensão do papel dos fatores ambientais na suscetibilidade às DCNT. Isso se deve ao fato de o risco de desenvolvimento de DCV ser determinado, entre outros fatores, por modificações epigenéticas que podem estar associadas a fatores ambientais, como tabagismo, uso de outras drogas, alcoolismo e padrões alimentares.[34] Essas alterações epigenéticas relacionam-se de maneira expressiva com mecanismos fisiopatológicos do estresse oxidativo envolvido no desenvolvimento das DCV.[35]

Em uma situação de homeostase, há equilíbrio entre as concentrações de ERO e o sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimático do organismo. O aumento na produção de ERO e/ou a deficiência do sistema antioxidante, com redução das concentrações intracelulares de compostos antioxidantes e da atividade de enzimas com tal função, provoca o desequilíbrio redox e resulta em estresse oxidativo.[36] Quando o sistema oxidante/antioxidante está em equilíbrio, a produção de ERO modula a atividade de diversas moléculas intracelulares e vias de sinalização (sinalização redox), com potencial para induzir alterações celulares agudas e crônicas. A sinalização redox desempenha papel central na angiogênese, na hipertrofia cardíaca e no processo aterosclerótico.[35]

No entanto, a produção excessiva de ERO expõe o DNA a um risco elevado de danos. Os mecanismos de reparo do DNA incluem mudanças na cromatina, abrangendo alterações no posicionamento do nucleossomo e acetilação e/ou metilação de histonas.[37] Nesse contexto, as enzimas histona acetiltransferase e histona desacetilase apontam a localização do dano no DNA, facilitando o acesso das proteínas de reparo, as quais bloqueiam a transcrição nos locais danificados, de modo a restaurar o ambiente e rearranjar a cromatina.[35]

Outro mecanismo que regula a expressão de genes é a metilação do DNA. A hipermetilação está associada com o silenciamento gênico, e a metilação das ilhas CpG pode bloquear a transcrição diretamente ao evitar o reconhecimento da região do DNA. Ainda, algumas proteínas podem ligar-se ao DNA metilado e bloquear o acesso de fatores de transcrição aos respectivos sítios de ligação.[38] As alterações promovidas pela metilação do DNA podem ser o mecanismo de ligação entre os fatores ambientais e a patogênese das DCV.[39]

É provável que as ERO influenciem o estado de metilação em lesões ateroscleróticas. Camundongos *knockout*

para genes que codificam enzimas envolvidas na metilação do DNA, incluindo os genes *Mthfr* e o que codifica a metiltransferase 1 (*Dnmt1*), apresentaram hipometilação do DNA. Com isso, houve aumento da expressão de interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8) nos leucócitos desses animais. A hipometilação do DNA em modelos animais *knockout* para o gene *Mthfr* precedeu a formação de estrias de gordura na aorta. A literatura acerca da relação entre epigenética e DCV, apesar de limitada, tem apontado a homocisteína como um biomarcador diretamente associado a mecanismos epigenéticos. Esse aminoácido parece induzir a metilação do DNA em células do músculo liso vascular, envolvidas diretamente com a aterogênese.[40]

Uma revisão narrativa destacou outros pontos já estabelecidos na relação entre epigenética e DCV. Ao isolar DNA de lesões ateroscleróticas humanas, o padrão apresentado foi de hipometilação. Entretanto, ao isolar material genético de linfócitos do sangue periférico em pacientes com DAC, os estudos são contraditórios em relação ao estado de metilação. Nessas células brancas, a região promotora de genes associados com a aterosclerose (genes que codificam a superóxido dismutase, a NOS3, o receptor de estrogênio alfa e a 15-lipoxigenase) apresentou-se hipermetilada. O conhecimento atual não permite esclarecer se as alterações epigenéticas apresentam associação causal com a aterosclerose ou se são simplesmente uma consequência do processo patológico.[41]

A hipótese de Barker aponta que estressores fetais, como a hipóxia, possam predispor a DCV em adultos.[42] Heijmans et al.[43] estudaram indivíduos que foram expostos a privação alimentar no período intrauterino durante o inverno holandês de 1944 a 1945. Ao compará-los com os irmãos do mesmo sexo mais novos e não expostos à privação de alimentos durante a vida intrauterina, verificaram que aqueles apresentavam padrão de metilação de DNA alterado, associado a modificações no metabolismo da glicose, maior prevalência de obesidade e de DCV. As mulheres apresentaram maior IMC e circunferência da cintura, e os homens, menores concentrações de HDL-c em relação aos controles. Houve, ainda, um padrão de hipometilação dos genes que codificam o fator de crescimento semelhante à insulina 2 (IGF2) e o INS-IGF2 (*insulin- insulin-like growth factor 2 read-through product*) e de hipermetilação dos genes *IL10*, *GNAS* e *MEG3* (*maternally expressed 3*) (codificação não proteica), bem como dos genes do transportador cassete de ligação de ATP, subfamília A, membro 1 (ABCA1) e da leptina (LEP) em comparação com os irmãos não expostos.

Já é reconhecido que padrões epigenéticos de pacientes com DCV diferem dos demais indivíduos. Entretanto, ainda não está claro se as alterações epigenéticas estão associadas às causas das DCV ou se são consequência da fisiopatologia destas.[35] A característica reversível das modificações epigenéticas tem despertado interesse em um possível uso terapêutico das enzimas modificadoras da conformação da cromatina. Assim, o estudo das histonas desacetilases e histonas metiltransferases tem sido uma promessa na farmacologia para o controle da transcrição de genes relacionados ao processo aterogênico. Além disso, a estratégia do uso de microRNA para reduzir a expressão gênica pós-transcricional em células endoteliais é outra vertente considerada.[35, 44]

Os fatores ambientais e genéticos justificam apenas uma pequena parcela da variabilidade no risco para as DCV. Nesse sentido, as modificações epigenéticas na expressão dos genes parecem ser o elo entre fatores de risco já reconhecidos e o desenvolvimento das DCV.[35]

Fatores ambientais, como nutrição, exposição a compostos químicos – como os presentes nos agrotóxicos e combustíveis de carros e aviões – e os hábitos de vida podem influenciar as modificações epigenéticas de acordo com o sexo.[45] Nesse sentido, tem sido investigado o papel de alguns compostos bioativos de alimentos na modulação epigenética, com consequente resposta na fisiopatologia das DCV. A suplementação de curcumina livre, polifenol presente na *Curcuma longa*, na dose de 50 mg/kg/dia, foi associada à inibição da atividade da histona acetiltransferase p300 (HAT p300), com controle da hipertrofia ventricular e preservação da função sistólica em ratos com insuficiência cardíaca.[46] A dose correspondente para um paciente de 70 kg é de 3,5 g por dia. O composto bioativo garcinol, extraído de uma fruta denominada *Garcínia cambogia*, também inibiu a atividade da HAT p300 em experimento *in vitro* com células de tumor mamário, com redução da expressão gênica global.[47]

Apesar dos estudos promissores que utilizam compostos bioativos de alimentos, são necessários novos ensaios clínicos para determinação da eficácia e da tolerância dessas substâncias pelo organismo humano. Também é preciso avaliar a biodisponibilidade e as formas de apresentação comercial desses compostos. Além disso, as doses recomendadas normalmente extrapolam a ofertada por meio da alimentação habitual, indicando a possível necessidade de suplementação.[44]

Já se sabe que as modificações epigenéticas podem ser transmitidas entre as gerações e afetar o risco de desenvolvimento de DCV.[48] Portanto, os mecanismos epigenéticos no desenvolvimento das DCV devem ser explorados a fim de permitir o desenvolvimento de terapias que atuem nos fatores de risco para essas doenças, bem como para tratamentos menos invasivos e redução dos efeitos colaterais. Deve-se considerar que a informação

genética não se altera entre as células e durante a vida do indivíduo, enquanto as informações epigenéticas sofrem alterações no decorrer da vida e entre células. Assim, os avanços no conhecimento da bioinformática são imprescindíveis para a construção de um mapa epigenético completo e complexo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos de genômica nutricional com vistas a compreender as alterações no metabolismo da homocisteína têm se aproximado do planejamento alimentar personalizado. Isto ocorre porque, ao identificar o perfil genético e verificar as diferentes respostas às intervenções alimentares em variadas populações, o sucesso de uma orientação nutricional com objetivo de controle da homocisteinemia e de redução do risco cardiovascular é maior. Além disso, os avanços nos estudos que abrangem a epigenética e a sua relação com o ácido fólico também são animadores, uma vez que os resultados sinalizam para condutas nutricionais factíveis na regulação da expressão gênica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. [WHO] World Health Organization. Global status report on noncommunicable diseases 2014. Geneva: World Health Organization; 2014. 280p.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Taxa de mortalidade específica por doenças do aparelho circulatório. 2013. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?idb2010/c08.def>. Acesso em: 7 abr. 2014.
3. World Health Organization. Creating an enabling environment for population-based salt reduction strategies: report of a joint technical meeting held by WHO and the Food Standards Agency, United Kingdom. Geneva: World Health Organization; 2010.
4. Di-Minno MN, Pezzullo S, Palmieri V, Coppola A, D'Angelo A, Sampietro F. et al. Genotype-independent in vivo oxidative stress following a methionine loading test: maximal platelet activation in subjects with early-onset thrombosis. Thrombosis Research. 2011;128(4):43-48.
5. Costa LA, Badawi ALAA, El-Sohemy A. Nutrigenetics and modulation of oxidative stress. Annals of Nutrition Metabolism. 2012;60(3):27-36.
6. Dragani A, Falco A, Santilli F, Basili S, Rolandi G, Cerasa L et al. Oxidative stress and platelet activation in subjects with moderate hyperhomocysteinaemia due to MTHFR 677 C→T polymorphism. Thrombosis and Haemostasis. 2012;108(3):533-42.
7. Poddar R, Sivasubramanian N, Dibello PM, Robinson K, Jacobsen DW. Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human aortic endotelial cells: implications for vascular disease. Circulation. 2001;103(22):2717-23.
8. Perla-Kaja'n J, Twardowski T, Jakubowski H. Mechanisms of homocysteine toxicity in humans. Amino Acids. 2007;32(4):561-72.
9. Undas A, Brozek J, Jankowski M, Siudak Z, Szczeklik A, Jakubowski H. Plasma homocysteine affects fibrin clot permeability and resis-tance to lysis in human subjects. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology. 2006;26: 1397-404.
10. Coronado MH, Salvador VL, Rey GT, Pérez JG, Peláez KM. Nutrigenética aplicada: dieta personalizada y formación académica para la práctica profesional. Revista Chilena Nutrición. 2011;38(4):492-500.
11. Humphrey LL, Fu R, Buckley DI, Freeman M, Helfand M. Periodontal disease and coronary heart disease incidence: a systematic review and meta-analysis. Journal of General Internal Medicine. 2008;23:2079-86.
12. Chen NC, Yang F, Capecci LM, Gu Z, Schafer AI, Durante W et al. Regulation of homocysteine metabolism and methylation in human and mouse tissues. Faseb Journal. 2010;24(8):2804-17.
13. Robinson K. Homocysteine, B vitamins and risk of cardiovascular disease. Heart and Education in Heart. 2000;83(2):127-30.
14. Blom HJ, Smulders Y. Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. Journal of Inherited Metabolic Disease. 2011;34(1):75-81.
15. Jacob MA, Bastos CC, Bonini-Domingos CR. The 844ins68 ystathionine beta-synthase and C677T MTHFR gene polymorphism and the vaso-occlusive event risk in sickle cell disease. Archives of Medical Science. 2011;1(1):97-101.
16. González-Gross M, Benser J, Breidenassel C, Albers U, Huybrechts I, Valtueña J et al. Gender and age influence blood folate, vitamin B12, vitamin B6, and homocysteine levels in European adolescents: the Helena Study. Nutrition Research. 2012;32(11):817-26.
17. Ding R, Lin S, Chen D. The association of cystathionine β synthase (CBS) T833C polymorphism and the risk of stroke: a meta-analysis. Journal of Neurologycal Science. 2012;15(1-2):26-30.
18. Zhang Y, Wang H, Sun HW, Chen YL, Ouyang JY, Wang Y et al. Correlation between cystathionineβ-synthase T883C genetic polymorphism and primary hypertension. Experimental and Therapeutic Medicine. 2014;8(3):713-18.
19. Liew SC, Gupta ED. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated diseases. Eur J Med Genet. 2015; 58(1):1-10.
20. Papa A, De-Stefano V, Danese S, Chiusolo P, Persichilli S, Casorelli I et al. Hyperhomocysteinemia and prevalence of polymorphisms of homocysteine metabolism – related enzymes in patients with inflammatory bowel disease. American Journal of Gastroenterology. 2001;96(9):2677-82.
21. Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. British Medical Journal. 2002;325(7374):1-7.
22. Amaral FM. Frequência dos polimorfismos nos genes da metileno-tetrahidrofolatoredutase (MTHFR) e cistationina beta-sintetase (CBS) em pacientes com evento trombótico da rede pública do Distrito Federal/Brasília e sua relação com os níveis de ácido fólico, vitamina B12 e homocisteína [dissertação]. Universidade de Brasília. Faculdade de Medicina. Pós-graduação em Patologia Molecular. Brasília; 2012.
23. Biselli PM, Guerzoni AR, Goloni-Bertollo EM, Godoy MF, Abou-Chahla JAB, Pavarino-Bertelli EC. Variabilidade genética MTHFR no desenvolvimento da doença arterial coronária. Revista da Associação Médica Brasileira. 2009;55(3):274-78.
24. Morais CC, Alves MC, Augusto EM, Abdalla DS, Horst MA, Cominetti C. The MTHFR C677T polymorphism is related to plasma concentration of oxidized low-density lipoprotein in ado-

lescents with cardiovascular risk factors. J Nutrigenet Nutrigenomics. 2015;8(3):105-13.
25. Konstantinidou V, Covas MI, Muñoz-Aguayo D, Khymenets O, De La Torre R, Saez G et al. In vivo nutrigenomic effects of virgin olive oil polyphenols within the frame of the Mediterranean diet: a randomized controlled trial. Faseb Journal. 2010;24(7):2546-57.
26. Konstantinidou V, Ruiz LA, Ordovás JM. Personalized nutrition and cardiovascular disease prevention: From Framingham to Predimed. Advances in Nutrition Research. 2014;14:368S-371S.
27. Zhang C, Wang ZY, Qin YY, Yu FF, Zhou YH. Association between B vitamins supplementation and risk of cardiovascular outcomes: a cumulative meta-analysis of randomized controlled trials. PLoS One. 2014;19(9):1371-74.
28. Huang T, Chen Y, Yang B, Yang J, Wahlqvist ML, Li D. Metanalysis of B vitamin supplementation on plasma homocysteine, cardio-vascular and all-cause mortality. Clinical Nutrition. 2012;31(4):448-54.
29. Martí-Carvajal AJ, Solà I, Lathyris D, Karakitsiou DE, Simancas-Racines D. Homocysteine-lowering interventions for preventing cardiovascular events. Cochrane Database of Systematic Review. 2013;31(1).
30. Anderson CA, Beresford SA, McLerran D, Lampe JW, Deeb S, Feng Z et al. Response of serum and red blood cell folate concentrations to folic acid supplementation depends on methylenetetrahydrofolate reductase C677T genotype: results from a crossover trial. Molecular Nutrition & Food Research. 2013;57(4):637-44.
31. Qin X, Li J, Cui Y, Liu Z, Zhao Z, Ge J et al. MTHFR C677T and MTR A2756G polymorphisms and the homocysteine lowering efficacy of different doses of folic acid in hypertensive Chinese adults. Nutrition Journal. 2012;11(2):112-22.
32. Ordovas JM, Corella D. Genetic variation and lipid metabolism: modulation by dietary factors. Curr Cardiol Rep. 2005;7(6):480-6.
33. Kim YI. Folate and colorectal cancer: an evidence-based critical review. Molecular Nutrition and Food Research. 2007;51(3):267-92.
34. Feinberg AP. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. Nature. 2007;447(7143):433-40.
35. Kim GH, Ryan JJ, Archer SL. The role of redox signaling in epigenetics and cardiovascular disease. Antioxidants and Redox Signalling. 2013;18(15):1920-36.
36. Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. Nature Reviews Drug Discovery. 2006;5(2):37-50.
37. Saha A, Wittmeyer J, Cairns BR. Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. Nature Reviews – Molecular Cell Biology. 2006;7(6):437-47.
38. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. Nature Genetics. 2003;33:245S-254S.
39. Handy DE, Castro R, Loscalzo J. Epigenetic modifications: basic mechanisms and role in cardiovascular disease. Circulation. 2011;123(19):2145-56.
40. Lund G, Zaina S. Epigenetics, transgenerational effects and risk factors for atherosclerosis. Current Opinion on Lipidology. 2009;20(2):150-51.
41. Turunen MP, Aavik E, Ylä-Herttuala S. Epigenetics and atherosclerosis. Biochimica et Biophysica Acta. 2009;1790(9):886-91.
42. Dover GJ. The Barker hypothesis: how pediatricans will diagnose and prevent common adult-onset diseases. Transactions of the American Clinical and Climatological Association. 2009;120:199-207.
43. Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H, Blauw GJ, Susser ES et al. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2008;105(44):17046-49.
44. Ordovás JM, Smith CE. Epigenetics and cardiovascular disease. Nature Reviews – Cardiology. 2010;7(9):510-19.
45. Gabory A, Attig L, Junien C. Sexual dimorphism in environmental epigenetic programming. Molecular and Cellular Endocrinology. 2009;304(1-2):8-18.
46. Morimoto TT, Sunagawa Y, Kawamura T, Takaya T, Wada H, Nagasawa A. The dietary compound curcumin inhibits p300 histone acetyltransferase activity and prevents heart failure in rats. Journal of Clinical Investigation. 2008;118:868-78.
47. Ahmad Z, Wang R. Apoptosis-inducing effect of garcinol is mediated by NF-κB signaling in breast cancer cells. Journal of Cellular Biochemistry. 2010;109(6):1134-41.
48. Byrne MM, Murphy RT, Ryan AW. Epigenetic modulation in the treatment of atherosclerotic disease. Frontiers in Genetics. 2014;364(5):1-25.

Câncer 25

Rita de Cassia Borges Castro
Danielle Fontes de Almeida
Cristiane Cominetti
Maria Aderuza Horst
Dan Linetzky Waitzberg

INTRODUÇÃO

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (Inca), entre 2014 e 2015 estimou-se um número de 576 mil casos novos de câncer no Brasil, com destaque para o câncer de pele do tipo não melanoma, que é o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata, mama feminina, cólon e reto, pulmão, estômago e colo do útero. Com base em projeções, estimava-se que 9 milhões de pessoas morreriam de câncer em 2015 e há a previsão de 11,4 milhões de mortes para o ano de 2030, caso não sejam tomadas as medidas preventivas necessárias.[1] Como fatores responsáveis pelo aumento do número de mortes por câncer, destacam-se o aumento da expectativa de vida da população e a adoção de estilos de vida denominados "ocidentalizados". Por outro lado, ressalta-se que cerca de 1/3 de casos novos de câncer podem ser prevenidos pela eliminação do tabagismo e de infecções como o vírus da hepatite C e o *Helicobacter pylori* e, também, por modificações alimentares.[2]

Câncer é um termo genérico utilizado para designar um grupo amplo de doenças complexas caracterizadas por danos celulares de diferentes origens, que envolvem alterações genéticas e epigenéticas. Na maioria dos casos, o câncer é resultante de alterações que se acumulam progressivamente no material genético de uma célula normal.[3] O desenvolvimento do câncer é chamado de carcinogênese e consiste em um processo ativo e dinâmico induzido em organismos vivos por agentes de natureza física, biológica ou química. Exemplos de tais agentes carcinogênicos incluem a radiação ultravioleta, o vírus da hepatite B (HBV) e as aminas heterocíclicas, respectivamente. Entre os princípios das bases moleculares, o dano genético não letal se configura como o responsável pelo início do processo carcinogênico.[4]

A carcinogênese pode ser dividida em três etapas básicas, denominadas iniciação, promoção e progressão, nas quais se acumulam várias alterações genéticas e epigenéticas. As alterações epigenéticas são herdadas durante a divisão celular e acarretam alteração do fenótipo, sem que ocorram, porém, mudanças na sequência de nucleotídeos do DNA.[5,6] A iniciação é determinada por eventos mutagênicos, resultantes de danos no DNA. Uma vez alterada, a célula iniciada adquire maior capacidade de proliferação em relação às células vizinhas, característica que é transmitida para todas as células originadas a partir dela (Figura 25.1).[7] A iniciação é um evento primordial para a carcinogênese e ocorre em poucas células do tecido, geralmente pela ação de substâncias genotóxicas com capacidade de induzir mudanças genéticas herdáveis nas células. Esses genotóxicos têm a capacidade de causar danos no DNA, induzindo mutações. A iniciação é considerada uma fase irreversível.[8]

A promoção, considerada uma fase reversível, ocorre após o insulto celular. Caracteriza-se pela expansão clonal de células iniciadas, que formam populações de células pré-neoplásicas. A progressão, por sua vez, é o estágio final da carcinogênese, quando ocorre a conversão de células pré-neoplásicas em populações de células invasivas e metastáticas (Figura 25.1).[4]

Assim, o câncer caracteriza-se pela perda do controle da proliferação celular e pela aquisição de características associadas com a progressão tumoral, como desdiferenciação, resistência à apoptose, capacidade de indução da angiogênese e transição epitélio-mesênquima,[9] que surgem como consequências em células que sofrem algum dano químico, físico ou biológico em seu material genético. A capacidade dos carcinogênicos de se ligarem aos ácidos nucleicos foi demonstrada pela primeira vez *in vivo* por Magee e Farber.[10] Assim, grupamentos eletro-

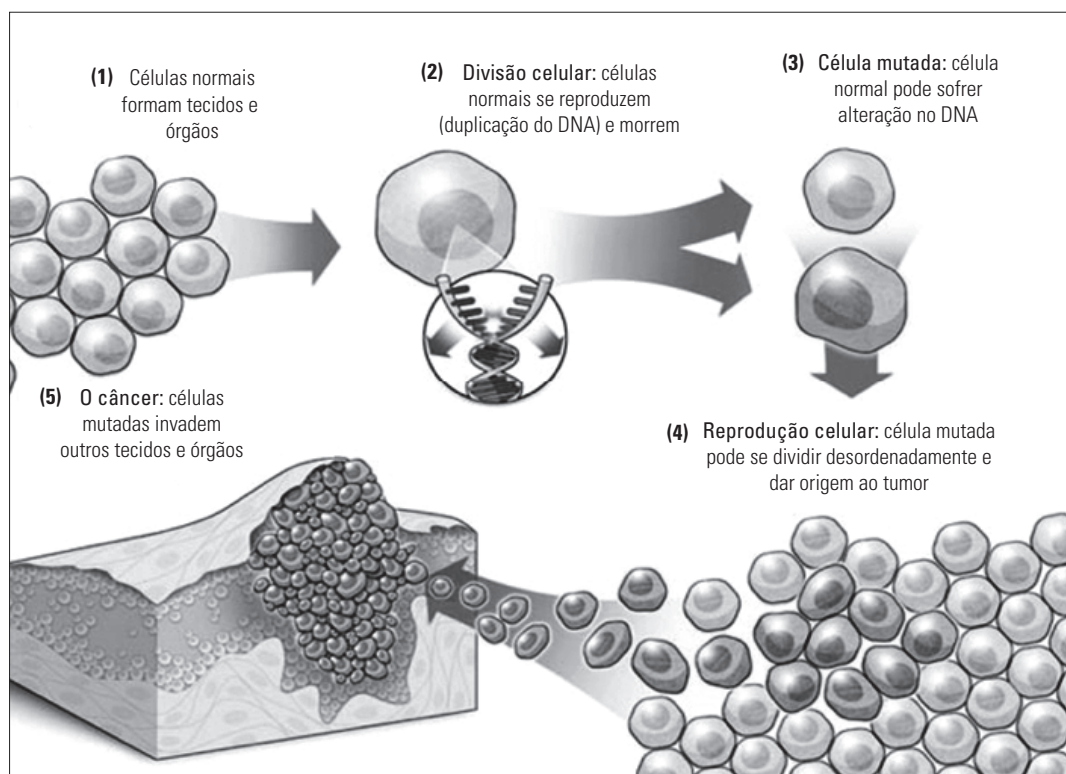



Figura 25.1 Estágios da carcinogênese. Em (2) está ilustrado um dano no DNA durante a divisão celular, caracterizando a fase de iniciação. Em (4) está representada a fase de promoção e, em (5), a fase de progressão.

fílicos altamente reativos de substâncias carcinogênicas promovem ataques a grupamentos nucleofílicos da molécula de DNA, formando adutos que, caso não sejam eliminados pelo sistema de reparo da célula, poderão originar transições, transversões e pequenas deleções no genoma celular, iniciando a carcinogênese.

Alterações genéticas que levam ao câncer incluem amplificação gênica, deleções, mutações pontuais, perda de heterozigose e rearranjos cromossômicos. Já as alterações epigenéticas incluem hipermetilação da região promotora de genes supressores tumorais, hipometilação global do DNA e específica de oncogenes, modificações pós-traducionais de histonas que alteram o estado de compactação da cromatina, bem como padrões alterados de expressão de microRNA. Diferentemente das alterações genéticas, que são irreversíveis, padrões epigenéticos aberrantes que resultam na carcinogênese são reversíveis. Com isso, estabelece-se a possibilidade de desenvolvimento de novas terapias baseadas na restauração de marcas e eventos epigenéticos característicos de células normais.[11]

Nutrientes e compostos bioativos de alimentos (CBA) têm destaque nesse cenário, por serem capazes de modular eventos envolvidos com todas as etapas da carcinogênese. Nesse sentido, estudos epidemiológicos ressaltam a interação entre a alimentação e o risco do desenvolvimento de câncer. Um dos trabalhos mais marcantes nesse contexto é o dos pesquisadores Doll e Peto,[12] que estimaram que cerca de 35% de todas as mortes causadas por câncer poderiam ser tanto atribuídas quanto até mesmo prevenidas por modificações a serem realizadas na alimentação. Esses pesquisadores consideraram a alimentação um contribuinte tão importante quanto o tabagismo para o desenvolvimento do câncer.

Após quase 30 anos da publicação de Doll e Peto, a World Cancer Research Foundation e o American Institute for Cancer Research (WCR/AICR) publicaram, em 2007, o documento "Alimentos, nutrição, atividade física e a prevenção do câncer: uma perspectiva global". Após ampla revisão da literatura por um grupo de especialistas, as evidências científicas foram traduzidas em orientações simples, como manter o peso dentro dos limites recomendados como saudáveis, limitar o consumo de alimentos e bebidas que promovem ganho de peso, ser fisicamente ativo, limitar o consumo de carne vermelha, evitar a ingestão de carnes processadas, consumir frutas e hortaliças, limitar o consumo de álcool e a ingestão de sal. Recomenda-se ainda aleitamento materno exclusivo até os seis meses de idade, uma vez que a amamentação protege a mãe do câncer de mama e está relacionada com a redução do risco de obesidade do filho na idade adulta.[13]

Entre as principais conclusões, destaca-se a de que o câncer é principalmente causado por fatores ambientais, dos quais os mais importantes são o tabagismo, a alimentação, o aumento da massa corporal, o sedentarismo e a exposição a carcinógenos.[14]

Estudos epidemiológicos demonstram que a relação entre a alimentação e o câncer é ambígua, no sentido de que a ingestão de carnes vermelhas, de gordura animal e de frituras pode aumentar o risco do desenvolvimento de câncer. Por outro lado, a ingestão de frutas, hortaliças, peixes e seus óleos é associada com a redução do risco do desenvolvimento de doenças malignas.[15]

O efeito protetor atribuído às frutas e hortaliças se deve ao fato de serem as principais fontes de micronutrientes e CBA. De acordo com Nicastro et al.,[16] os benefícios muitas vezes estão associados ao fato de esses compostos apresentarem características antioxidantes, relacionadas à redução do risco de danos no DNA, além de auxiliarem nos processos de reparo de DNA, supressão da expressão de oncogenes, ativação da expressão de genes supressores tumorais, indução da apoptose e diferenciação celular, modulação da angiogênese e das concentrações hormonais e da resposta imunológica.

Evidências sugerem que a quimioprevenção por meio do consumo de CBA pode reduzir a morbidade e a mortalidade por câncer, por meio da modulação das vias metabólicas relacionadas à carcinogênese.[17] Alguns exemplos de CBA são o resveratrol proveniente de algumas variedades de uva, o licopeno presente no tomate, a genisteína de produtos da soja, os ácidos graxos ômega-3 presentes nos óleos de peixe, o sulforafano das hortaliças crucíferas, entre outros. Esses componentes alimentares participam de processos bioquímicos e fisiológicos, demonstrando papéis importantes na redução do risco e no tratamento de doenças crônicas, incluindo o câncer.[18,19]

O principal desafio é entender, no que se refere a mecanismos moleculares, como componentes de alimentos podem influenciar o processo neoplásico a fim de fornecer conhecimentos para o desenvolvimento de estratégias quimiopreventivas eficazes.[20] Estudos de genômica nutricional têm como foco identificar e compreender as interações em nível molecular entre nutrientes e CBA com o genoma e as consequências funcionais na expressão gênica, por meio da utilização de tecnologias de alto desempenho que avaliam a genômica, a transcriptômica, a epigenômica, a proteômica e a metabolômica. Esses conhecimentos contribuem para o planejamento de dietas personalizadas, permitindo uma abordagem mais eficiente na redução do risco e no tratamento de doenças como o câncer, especialmente em indivíduos carreadores de variações genéticas que aumentam o risco do desenvolvimento da doença.[16]

O genoma está sujeito a insultos frequentes ocasionados por vários agentes exógenos ou provenientes do próprio metabolismo celular normal. Isso é contrabalanceado por mecanismos de defesa que objetivam minimizar os danos em DNA (como a destoxificação de compostos com potencial mutagênico e o sequestro de radicais livres), promover o reparo desses danos e induzir a apoptose em células alteradas. Todos esses eventos são mediados por enzimas específicas, e os genes que as codificam podem apresentar polimorfismos relacionados ao aumento do risco do desenvolvimento de câncer.[21-23]

Este capítulo descreve estudos de genômica nutricional e câncer que possibilitam o entendimento molecular das interações entre essa doença e a nutrição.

POLIMORFISMOS GENÉTICOS, NUTRIENTES E CÂNCER

Nutrigenética

Um grupo de pesquisadores da clínica Mayo, nos Estados Unidos, publicou, desde 1998, uma série de trabalhos sobre o consumo de hortaliças e nutrientes com capacidade antioxidante, a suscetibilidade genética e o risco do desenvolvimento de diferentes tipos de tumor.[24] Um resumo das principais descobertas desses pesquisadores está descrito no Quadro 25.1.

Enzimas de fase I (ativação)

Os agentes pró-carcinogênicos são usualmente metabolizados em estados reativos diferentes para posterior conjugação e excreção. As enzimas de fase I do metabolismo de xenobióticos realizam processos de oxidação, hidrólise e redução, enquanto as enzimas de fase II catalisam reações de conjugação, tornando a molécula em estado intermediário mais hidrofílica, o que permite sua excreção do organismo pela urina. Uma vez que genes que codificam as enzimas envolvidas no metabolismo de xenobióticos podem apresentar polimorfismos com alta prevalência em diferentes populações, estes são considerados potenciais candidatos para investigação sobre o aumento da suscetibilidade ao câncer.[25]

Estudos experimentais ressaltam a influência de carcinógenos químicos, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e as aminas heterocíclicas, na iniciação da carcinogênese. Esses compostos estão presentes na fumaça do tabaco e também são formados na carne quando esta é submetida ao fogo direto ou a temperaturas elevadas por longo período. Entretanto, para que esses compostos se tornem ativos, é necessária sua biotransformação mediada por enzimas de fase I, as quais são

Quadro 25.1 Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) relacionados ao aumento do risco do desenvolvimento de câncer e interações com alimentos ou nutrientes

Gene/função da proteína	Símbolo do gene	SNP	Identificação do SNP	Interação com nutrição
Glutationa-S-transferases: enzimas de destoxificação capazes de catalisar a conjugação de xenobióticos com a glutationa	*GSTM3* *GSTP1* *GSTP1*	-/AGG I105V A114V	rs1799735 rs947,894 rs1799811	Compostos presentes nas hortaliças crucíferas atuam como indutores da expressão de GST
NAD(P)H-quinona desidrogenase: enzima antioxidante que reduz a ubiquinona a ubiquinol	*NQO1*	P187S	rs1800566	Compostos presentes nas hortaliças crucíferas atuam como indutores da expressão de NQ01
N-acetiltransferase 1: enzima de fase II que catalisa a N ou O-acetilação de vários substratos e promove a bioativação de compostos pró-carcinogênicos, incluindo as aminas heterocíclicas	*NAT1*	V149I R187Q	rs4987076 rs13249533 rs1057126 rs15561	Compostos presentes nas hortaliças crucíferas podem induzir a expressão de NAT1 e NAT2
N-acetiltransferase 2: responsável pelo fenótipo acetilador, que tem sido associado a danos no DNA por compostos pró-carcinogênicos que se submetem à N-acetilação	*NAT2*	Y94Y I114T L161L R197Q R268K G286E	rs1041983 rs1801280 rs1799929 rs1799930 rs1208 rs1799931	Compostos presentes nas hortaliças crucíferas podem induzir a expressão de NAT1 e NAT2
Citocromo P450: enzimas de fase I que metabolizam pró-carcinógeneos a intermediários cancerígenos	*CYP1A1* *CYP1A2*	I462V –154A>C	rs1048943 rs762551	Compostos presentes nas hortaliças crucíferas podem diminuir a bioativação de carcinógenos, inibindo enzimas CYP450
Superóxido dismutase: catalisa a conversão de radicais superóxido em peróxido de hidrogênio	*SOD2*	V16A	rs1799725	O zinco é um componente da enzima e pode estabilizá-la
Glutationa peroxidase: catalisa a conversão de peróxido de hidrogênio em água utilizando selênio como cofator	*GPX1*	P198L	rs1050450	Enzima dependente de selênio ↑ zinco pode alterar o equilíbrio entre as atividades SOD2/GPX1
Mieloperoxidase: catalisa a conversão/neutralização de peróxido de hidrogênio para o pró-oxidante ácido hipocloroso (HOCl)	*MPO*	-642G>A	rs2333227	↑ produção de HOCl pode oxidar a SOD2 Zinco pode atuar como modificador da atividade da MPO
Óxido nítrico sintase 2A (induzível): sintetiza óxido nítrico, radical livre com atividade antimicrobiana e antitumoral Caso a sua produção não seja devidamente controlada, pode causar danos ao DNA	*NOS2A*	S608L	rs2297518	Vegetais de folhas verde-escuras, luteína e zeaxantina podem proteger contra o excesso de produção de radicais livres Zinco é necessário para a função e atividade da NOS2A
8-oxoguanina DNA glicosilase: enzima de reparo do DNA. Tem a capacidade de excisar nucleotídeos alterados do DNA, formados pela ação de compostos mutagênicos ou de radicais livres	*OGG1*	S326C	rs1052133	Vegetais de folhas verde-escuras, luteína e zeaxantina podem modular a expressão da OGG1
X-ray repair cross-complementing: enzima de reparo do DNA	*XRCC1*	Q399R R280H	rs25487 rs25489	Vegetais de folhas verde-escuras, luteína, zeaxantina e zinco podem desempenhar papel no reparo do DNA

Fonte: adaptado de Kelemen et al.[24]

responsáveis pela ativação metabólica de carcinogênicos indiretos. Entre essas enzimas, pode-se destacar a citocromo P-450 dependente de mono-oxigenase (CYP-450), que converte pró-carcinogênicos inócuos em intermediários eletrofílicos quimicamente reativos.[26]

Das enzimas de fase I, destacam-se a CYP1A1, a CYP1A2 e a CYP1B1, como as principais enzimas bioativadoras de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e de aminas heterocíclicas. A expressão dessas três enzimas é induzida pela interação de agentes tóxicos com receptor

de hidrocarbonetos aromáticos (AHR), que atua como fator de transcrição e forma dímeros com o translocador nuclear do AHR (ARNT), antes de interagir com os promotores correspondentes aos genes das CYP.[27] Dessa forma, SNP em genes que codificam o AHR e o ARNT podem estar relacionados à potencialização dos efeitos de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e de aminas heterocíclicas, contribuindo para o risco do desenvolvimento de câncer.

Nesse sentido, Wang et al.[28] investigaram mais de 50 polimorfismos nos genes *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*, *AHR* e *ARNT* com o objetivo de verificar a influência dos polimorfismos em diferentes estágios de câncer colorretal, bem como associá-los com o consumo de determinados alimentos. Assim, foram realizadas comparações entre uma coorte de 1.016 casos de adenomas e 1.355 controles e outra abrangendo 498 casos de câncer colorretal e 609 controles de etnias japonesa, caucasiana e nativos do Havaí. Após os ajustes para comparações múltiplas, a única associação que permaneceu estatisticamente significativa foi entre o rs12410394 no *ARNT* e o câncer colorretal. Também foi observada associação marginalmente significativa com câncer colorretal para rs2470890, rs11072508 e rs4886410 no *CYP1A2*. Tais SNP não foram relacionados com o maior risco de adenoma, sugerindo que o risco genético pode ser mais relevante para fases mais avançadas da doença.

Ainda no mesmo estudo, os autores utilizaram um questionário de frequência alimentar com mais de 200 itens e realizaram o cálculo para a ingestão das aminas heterocíclicas PhIP, MeIQx, Di-MeIQx. Isso permitiu concluir que indivíduos carreadores do genótipo TT para o rs1056837 do gene *CYP1B1* que consumiam mais Di-MeIQx (2 ng/dia) apresentaram risco aumentado de câncer colorretal quando comparados aos que consumiam quantidades menores (0,25 ng/dia). Já para os indivíduos com adenomas, o efeito do consumo total de carnes foi diferente entre os genótipos do rs3757824 no *AHR,* sendo o risco maior em carreadores do genótipo TT e menor entre os com genótipo CC. Esses dados sugerem que a interação entre o genótipo de risco e a exposição a fatores ambientais é necessária para determinar o surgimento do câncer colorretal.[28] Além disso, a permanência de carcinogênicos ativos no organismo, que é determinada pela eficiência do processo de destoxificação, também pode influenciar esse risco.

Enzimas de fase II (destoxificação)

Os genes que codificam enzimas relacionadas com a destoxificação do organismo merecem destaque, pois o equilíbrio entre absorção, ativação e eliminação de compostos potencialmente carcinogênicos tem papel importante na prevenção de danos ao DNA. Assim, a habilidade de metabolizar e eliminar os xenobióticos pode ser considerada uma das primeiras linhas de defesa do organismo contra o desenvolvimento do câncer.[29]

As glutationa-S-transferases (GST) constituem a família de isoenzimas de fase II mais importante do organismo humano. São responsáveis por catalisar a reação entre a glutationa e compostos lipofílicos, mediando, assim, a destoxificação de vários compostos, incluindo agentes cancerígenos, quimioterápicos e toxinas ambientais. Nesse sentido, desempenham papel crítico na proteção celular, e variações que ocasionem fun cionamento inadequado desse sistema podem resultar em aumento do risco do desenvolvimento de câncer.[30] Um dos exemplos mais bem documentados na literatura diz respeito a polimorfismos em genes que codificam as GST M1 (GSTM1) e T1 (GSTT1).

O gene *GSTM1,* de localização cromossômica 1p13.3, contém dez éxons e codifica a classe *mu* de GST. Já o *GSTT1* está na localização cromossômica 22q11.23 e contém seis éxons, que codificam a classe *teta* de GST. As variações mais comuns em ambos os genes é a deleção em homozigose, que resulta no chamado genótipo nulo, ou seja, a não expressão da enzima e, consequentemente, maior vulnerabilidade a danos citogenéticos e oxidativos ao DNA, além de maior suscetibilidade ao câncer.[31]

Economopoulos e Sergentanis[32] realizaram metanálise compreendendo 44 estudos com o *GSTM1* (11.998 casos e 17.552 controles) e 34 estudos com o *GSTT1* (8.596 casos e 13.589 controles), com o intuito de relacionar polimorfismos nesses genes e o risco do desenvolvimento de câncer colorretal. De maneira interessante, os autores concluíram que a deleção da GSTM1 ou da GSTT1 aumenta o risco do desenvolvimento de câncer em caucasianos, mas não em chineses. Por outro lado, Li et al.[21] realizaram metanálise de 33 estudos caso-controle compreendendo 8.502 pacientes com câncer colorretal e 13.699 controles em indivíduos asiáticos. Em resumo, a avaliação permitiu concluir que o genótipo nulo para a GSTM1 confere risco aumentado para o desenvolvimento de câncer colorretal, em especial em indivíduos chineses.

Xu et al.[33] avaliaram, em metanálise, a relação entre o genótipo nulo para a GSTM1 e o risco do desenvolvimento de câncer de ovário em 11 estudos, incluindo 2.709 casos e 3.599 controles. Foram incluídos estudos com mulheres do Reino Unido, Brasil, Alemanha, Estados Unidos e Austrália, e os pesquisadores concluíram que o genótipo nulo não contribui para o aumento do risco desse tipo de câncer. Esses dados apontam para a importância da avaliação de diferentes marcadores gené-

ticos para cada tipo de câncer e, ainda, sobre a necessidade de avaliação da interação do genótipo com fatores ambientais, não considerada nas três metanálises citadas anteriormente.

Nesse sentido, a alimentação tem destaque, pois parece reduzir o risco do desenvolvimento de câncer em carreadores do genótipo nulo para a GSTM1, investigado em metanálise incluindo 33 trabalhos sobre o consumo de hortaliças crucíferas e o risco de câncer colorretal. O consumo de hortaliças foi avaliado por questionário de frequência alimentar, por recordatório ou por excreção urinária de isotiocianatos (ITC). A análise de um subgrupo de oito trabalhos que avaliaram também polimorfismos nos *GSTM1* e *GSTT1* (1.777 casos de câncer e 1.546 casos de adenomas) permitiu concluir que a ingestão de hortaliças crucíferas reduz o risco do desenvolvimento de câncer colorretal em indivíduos com genótipo nulo para tais enzimas.[34]

Os efeitos protetores do consumo de hortaliças crucíferas estão relacionados aos ITC, compostos oriundos da degradação de glicosinolatos, com potente ação biológica e presentes quase exclusivamente em hortaliças dessa família. Os ITC apresentam a capacidade de induzir a expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes e de destoxificação, via ativação do *fator nuclear eritroide* relacionado ao fator 2 (fator de transcrição designado Nrf2). Além disso, a via de excreção de ITC é mediada por sua conjugação à glutationa, catalisada por GST. Portanto, indivíduos com genótipo nulo podem demorar mais para excretar esses compostos.[35]

Apesar de serem classificadas como enzimas de fase II, as N-acetiltransferases 1 e 2 (NAT1, NAT2) estão envolvidas na bioativação de xenobióticos por meio de O-acetilação. Polimorfismos no *NAT1* e *2* podem ser utilizados para prever o fenótipo de acetilador rápido, intermediário ou lento.[36] Em estudo de coorte multiétnico, foram avaliados 1.009 casos de câncer colorretal e 1.522 controles para investigar a hipótese de que acetiladores rápidos são mais suscetíveis ao risco de câncer colorretal, por ativarem mais rapidamente as aminas heterocíclicas em carcinógenos. O risco do desenvolvimento de câncer colorretal entre tabagistas foi maior em acetiladores rápidos quando comparados aos lentos e intermediários. Entretanto, não foram observadas associações entre os diferentes genótipos e o consumo de carne vermelha.[37]

Caso carcinógenos e espécies reativas de oxigênio (ERO) não sejam adequadamente eliminados do organismo antes de reagirem com o DNA, pode ocorrer a formação de adutos de DNA, os quais, se não forem reparados, podem iniciar a carcinogênese ou influenciar as etapas de promoção e progressão.

Enzimas de reparo do DNA

As variações em genes que codificam enzimas de reparo também podem estar relacionadas ao aumento da suscetibilidade ao desenvolvimento do câncer. Polimorfismos nesses genes podem estar envolvidos com a redução da capacidade do sistema de reparo do DNA, especialmente quando este é exposto a agentes genotóxicos exógenos e endógenos, o que contribui para o risco de desenvolvimento de diversos tipos de câncer.[38, 39]

Danos em DNA ocasionados por ERO ou por carcinógenos estão implicados na iniciação da carcinogênese. Um dos produtos mais abundantes dessa oxidação é o aduto 8-hidroxideoxi-2-guanosina (8-OHdG), e sua formação reflete os danos oxidativos sofridos pelo DNA. Esse aduto configura-se em um dano promutagênico e causa um tipo específico de mutação, a transversão de guanina:citosina (G:C) para timina:adenina (T:A), que é intimamente relacionada à carcinogênese.[40]

Por outro lado, eucariotos apresentam a capacidade de reparar danos em DNA por meio da ação de enzimas. Especificamente, a enzima responsável pela excisão da 8-OHdG é a 8-oxoguanina DNA glicosilase, codificada pelo gene *OGG1*. O polimorfismo mais comum nesse gene é a troca de uma serina por uma cisteína na posição 326 da cadeia polipeptídica (Ser326Cys, rs1052133). Em metanálise de 109 estudos, envolvendo 34.041 casos de câncer e 42.730 controles, o alelo Ser foi associado com o aumento do risco de câncer de pulmão, do sistema digestório e de cabeça e pescoço.[23]

Com relação às interações com a alimentação, um estudo investigou as associações possíveis entre o polimorfismo Ser326Cys e a ingestão de frutas e hortaliças – bem como do tabagismo – no desenvolvimento do câncer em 431 indivíduos com câncer de pulmão e 796 controles. Houve uma interação significativa entre o genótipo homozigoto Cys/Cys e a ingestão de hortaliças, resultando em redução de 54% no risco de câncer de pulmão no grupo que consumiu 50% a mais de hortaliças. Entretanto, no grupo carreador do genótipo considerado de risco (Ser/Ser ou Ser/Cys), não houve interação. A mesma tendência foi observada em relação ao consumo de frutas, e não houve interação entre o polimorfismo Ser326Cys da OGG1 e o tabagismo.[41]

Grande interesse tem sido voltado para estudos com câncer e impacto de polimorfismos em genes que codificam enzimas antioxidantes. Pesquisadores sugerem que polimorfismos nesses genes resultam em menor atividade enzimática, com consequente maior risco de desenvolvimento de câncer em razão da menor capacidade de neutralização de ERO.[42] Informações detalhadas sobre tais polimorfismos podem ser obtidas no Capítulo 29.

A suscetibilidade individual para o desenvolvimento do câncer pode, ainda, resultar de variações em genes envolvidos na carcinogênese, como aqueles relacionados ao controle da proliferação celular, apoptose e transição epitélio-mesênquima (TEM). A expressão de genes envolvidos nesses processos, bem como de todos os citados anteriormente, pode ser modulada por alimentos e CBA, atividade que é um dos objetos de estudo da nutrigenômica.

NUTRIGENÔMICA E CÂNCER

Frutas, hortaliças e compostos bioativos de alimentos

Estudos epidemiológicos demonstram estreita relação entre o consumo aumentado de frutas e hortaliças e a redução do risco do desenvolvimento de câncer, por meio de ações atribuídas aos CBA presentes nesses alimentos.[43, 44] A interpretação dos resultados de estudos epidemiológicos pode ser prejudicada pelo fato de a carcinogênese ocorrer em múltiplas etapas, envolvendo uma sequência de eventos que pode durar décadas. Além disso, a natureza complexa da alimentação é uma das principais limitações de estudos em nutrição, pois dificulta a associação entre o risco do desenvolvimento de câncer e um único fator de exposição. Entretanto, na era pós-genoma, é possível elucidar os mecanismos moleculares pelos quais os CBA exercem suas atividades quimiopreventivas associadas à modulação de processos determinantes da carcinogênese, ilustrados na Figura 25.2.

Para exercer efeitos benéficos na promoção da saúde humana, os componentes alimentares podem atuar em diferentes momentos da expressão gênica, como no estímulo inicial para que ocorra a transcrição, na ligação com receptores, na modulação de eventos epigenéticos e nas modificações pós-traducionais em proteínas específicas. Assim, nutrientes e CBA alteram a expressão de genes de maneira direta ou indireta. Por exemplo, o resveratrol e a genisteína influenciam indiretamente a transcrição de genes por meio da ativação ou da inibição de vias de sinalização molecular, como a do Nrf2 e do fator nuclear kappa B (NF-κB). Por outro lado, vitaminas A e D e ácidos graxos apresentam ações diretas, pois ativam receptores nucleares que induzem a transcrição.[45]

O estudo da atividade quimiopreventiva de alimentos é interessante, uma vez que os seus componentes, incluindo fibras, micronutrientes (como vitaminas C, E e do complexo B) e CBA (como carotenoides, polifenóis e glicosinolatos) interagem entre si e sinergicamente na modulação de alvos moleculares ou de vias metabólicas. Entretanto, a elucidação dos mecanismos de ação geralmente só é possível por meio da administração de CBA

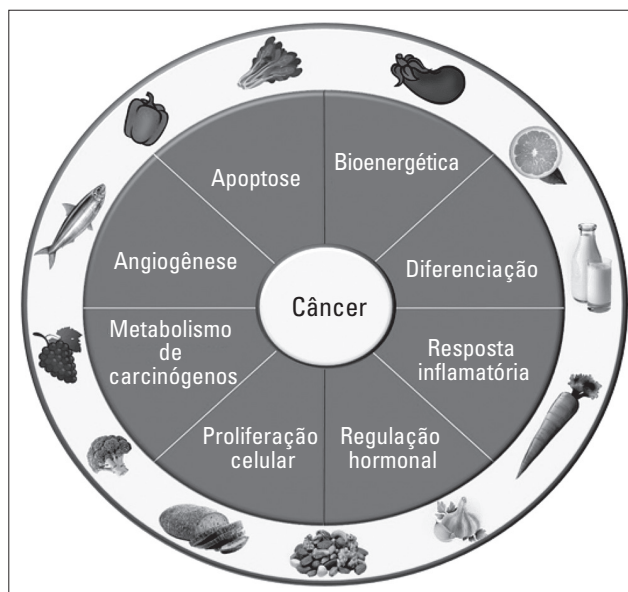



Figura 25.2 Processos determinantes da carcinogênese e alguns alimentos que contêm CBA capazes de modular tais eventos.

isolados. Como exemplo, pode-se dar destaque às hortaliças crucíferas, que estão relacionadas com a redução do risco do desenvolvimento de diferentes tipos de câncer em estudos epidemiológicos.[46] Elas chamam a atenção, em especial, por seu alto teor de glicosinolatos, mas também podem conter carotenoides e folato. Seus mecanismos de ação incluem ativação do Nrf2, via de ação de isotiocianatos e consequente indução da transcrição de genes que contêm o elemento de resposta antioxidante (ERA) em sua região promotora, como os de enzimas antioxidantes e de fase 2, em especial as GST.[34]

Outra relação interessante ocorre entre o câncer de próstata e o consumo de tomate e seus produtos, em que a redução do risco da doença é atribuída ao licopeno. Em um estudo duplo-cego randomizado controlado com placebo, 105 homens afro-americanos com indicação de biópsia para confirmação de diagnóstico de câncer de próstata consumiram molho de tomate contendo 30 mg/dia de licopeno ou placebo durante 21 dias. As concentrações sanguíneas de antígeno específico da próstata (PSA) e de licopeno foram aferidas, e o grupo que consumiu o molho de tomate apresentou aumento das concentrações séricas de licopeno e redução do PSA, enquanto o grupo placebo apresentou resultado inverso. Entretanto, a duração desse estudo foi provavelmente insuficiente para concluir se houve ou não redução no risco do desenvolvimento de câncer de próstata.[47]

Estudos em culturas de diferentes tipos de células auxiliam no entendimento das vias moleculares moduladas pelo licopeno, dentre as quais se destacam a via da AKT e a da beta-catenina, cronicamente ativadas na carcinogênese (Figura 25.3).[48]

Apesar de existirem evidências positivas com relação ao licopeno e a redução do risco de câncer, é importante destacar que suplementação com doses altas do composto isolado pode exercer efeitos prejudiciais. Hwang e Bowen[49] investigaram o potencial protetor do licopeno contra danos oxidativos no DNA de células humanas de câncer de próstata (LNCaP) e observaram não apenas a falha na proteção contra lesões oxidativas do DNA em concentrações de licopeno que mimetizam as fisiológicas (0,1-1 mcM), como também efeito pró-oxidante em concentrações mais elevadas (> 5 mcM). O mesmo efeito também foi demonstrado por Lowe et al.,[50] em estudo utilizando linhagem de células de carcinoma do cólon (HT29). Doses baixas (1-3 mcM) de licopeno ou betacaroteno protegeram o DNA contra danos. No entanto, ao aumentar a concentração (4-10 mcM) dos carotenoides, o efeito oposto foi observado. Portanto, as ações anti e pró-oxidantes do licopeno em cultura de células parecem ser dose-dependentes.

O chá-verde é a bebida mais consumida no mundo depois da água, e apresenta como principal componente bioativo a epigalocatequina galato (EGCG). Entre os efeitos positivos na saúde atribuídos ao consumo de chá-verde, está a redução do risco do desenvolvimento de câncer.[51] Nesse sentido, os mecanismos moleculares relacionados às atividades quimiopreventivas dessa bebida, com relação ao câncer de cavidade oral, foram compilados em uma revisão. A EGCG pode modular a via ativada por proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), promovendo a inibição do crescimento celular. Também atua via inibição do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), por meio do bloqueio da fosforilação estimulada pelo seu receptor, além de estimular a apoptose por ativa-

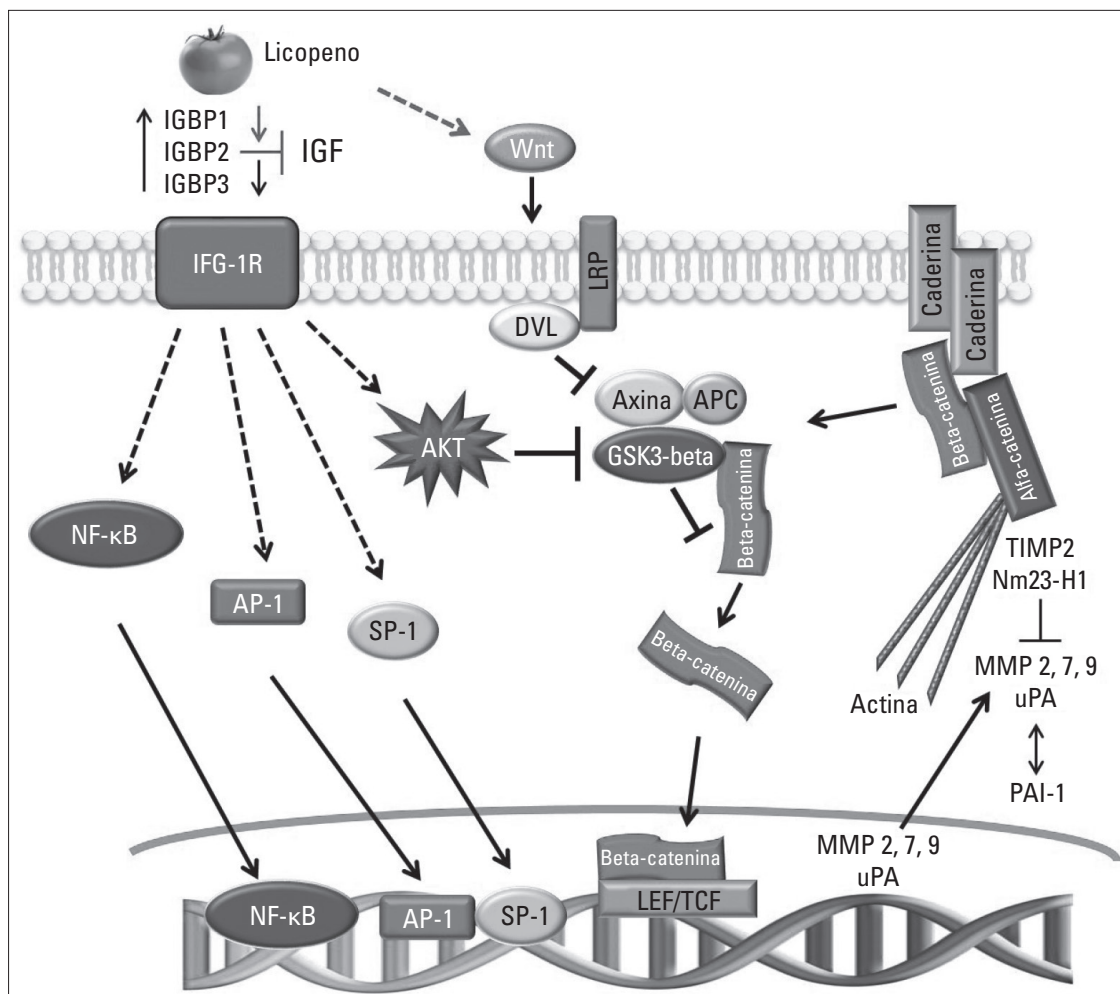



Figura 25.3 O licopeno inibe a via da Wnt/beta-catenina. Na ausência de WNT – um complexo multiproteico que inclui axina, APC e GSK3-beta – desestabiliza a beta-catenina, a qual é fosforilada pela GSK3-beta e subsequentemente degradada pelo proteassoma. A ligação da Wnt aos seus receptores de superfície celular Fzd e Lrp 5/6 inibe a fosforilação da beta-catenina pela GSK3-beta, permitindo que ela se acumule no citosol. A beta-catenina então se transloca para o núcleo, onde se liga e ativa os fatores de transcrição LEF/TCF e induz a expressão gênica. O licopeno aumenta a expressão da E-caderina, da proteína nm23-H1 e da TIMP2, bem como a atividade da GSK3-beta. Além disso, ele reduz os níveis das metaloproteinases de matriz (MMP 2, 7 e 9), da uPA e da beta-catenina. O licopeno também exerce seus efeitos antimetastáticos por meio da inativação de fatores de transcrição (NF-kB, AP-1, SP-1 e LEF/TCF). **Fonte:** adaptada de Trejo-Solís et al.[48]

ção da via das caspases e por inibição das proteínas antiapoptóticas BCL2 (*B-cell CLL/lymphoma 2*) e BCL-XL (*B-cell lymphoma-extra large*). A apoptose e o bloqueio da progressão do ciclo celular ainda podem ser modulados via p53. Outras proteínas envolvidas na carcinogênese e reguladas negativamente pela EGCG incluem a ciclina D1, as metaloproteinases de matriz (MMP) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).[52]

Outro composto que apresenta atividades quimiopreventivas é a curcumina, encontrada na raiz de *curcuma longa* (conhecida também como açafrão-da-terra). Esse CBA pode modular alvos moleculares importantes, como fatores de transcrição, fatores de crescimento, citocinas pró-inflamatórias, proteínas quinases e outras moléculas relacionadas à carcinogênese (Figura 25.4).[53] O potencial anticarcinogênico da curcumina foi demonstrado em mais de 65 ensaios clínicos, com atividade protetora em vários tipos de câncer, como pulmão, mama, próstata, pâncreas, colorretal, mieloma múltiplo e cabeça e pescoço.[54]

Outros CBA foram descritos como quimiopreventivos por apresentarem capacidade de modular a expressão da p53, considerada a proteína guardiã do genoma. A modulação da expressão e da atividade da p53 mediada por CBA ocasiona a redução da expressão de ciclo-oxigenase 2 (COX-2), da ciclina D1, do NF-kB, do *signal transducer and activator of transcription* (STAT) e do fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), além de induzir a parada do ciclo celular e/ou a apoptose. Exemplos de compostos capazes de modular positivamente a p53 são as isoflavonas, como a daidzeína e a genisteína, presentes principalmente na soja e seus derivados. Em estudo *in vitro,* a daidzeína inibiu o crescimento de células de câncer de mama T-47D. Esse evento foi mediado pelo atraso da progressão das fases do ciclo celular, ocasionado por uma "parada" na fase G2/M, possivelmente por ativação da p53.[55]

As vias moleculares por meio das quais CBA presentes em frutas e hortaliças exercem efeitos quimiopreventivos são muito semelhantes. O principal desafio atual é o estabelecimento das doses necessárias para que os efeitos ocorram. Contudo, há consenso entre os pesquisadores de que o consumo de ao menos quatro porções de frutas e hortaliças diárias é o mínimo para a obtenção dos efeitos benéficos na promoção da saúde.[13]

Vitamina D

Mecanismos moleculares têm sido propostos para elucidar os efeitos da vitamina D no câncer. Muitos desses mecanismos estão relacionados com a produção de 1,25-di-hidroxivitamina D3 [1,25$(OH)_2$D3]. De maneira interessante e contrária ao que se acreditava há pouco tempo, a enzima 1-alfa hidroxilase é expressa em uma ampla gama de tecidos extrarrenais, incluindo pâncreas, cólon, glândulas adrenais, cérebro, placenta e linfono-

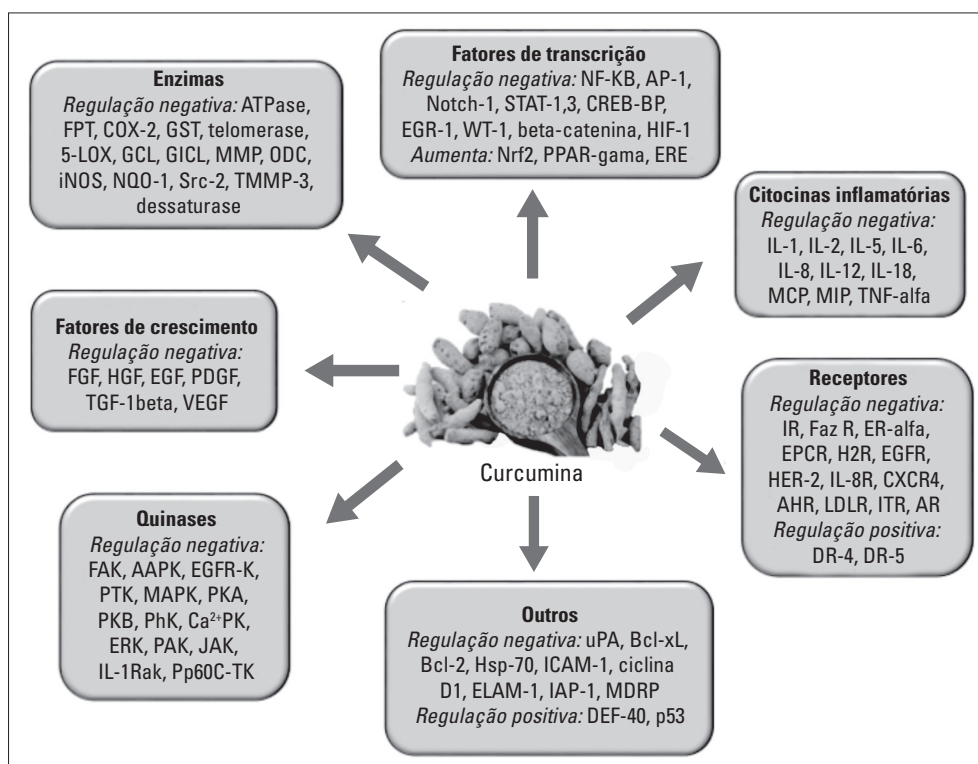



Figura 25.4 Enzimas, fatores de transcrição, citocinas inflamatórias, receptores, quinases e outras proteínas reguladas pela ação da curcumina.
Fonte: adaptada de Shanmugam et al.[53]

dos.[56] Nas células desses tecidos, os eventos biológicos de maior relevância mediados pela vitamina D ocorrem a partir da interação entre a 1,25$(OH)_2$D3 com o seu receptor (VDR, *vitamin D receptor*). Estudos têm verificado que uma maior expressão do receptor de vitamina D está diretamente relacionada com a modulação da proliferação e da diferenciação celular, bem como na indução de apoptose em células tumorais.[57] A 1,25$(OH)_2$D3 liga-se ao VDR na célula-alvo, formando um complexo que migra para o núcleo celular. No núcleo, esse complexo liga-se ao RXR, originando um heterodímero que interage com sequências específicas do DNA (elementos de resposta à vitamina D – VDRE) na região promotora de diversos genes, modulando a transcrição destes.[58-61]

Polimorfismos no gene que codifica o VDR foram identificados em pacientes com diferentes tipos de câncer (cólon, próstata, mama, intestino), o que sugere que a função das células neoplásicas pode ser influenciada por ações mediadas pela 1,25$(OH)_2$D3.[62, 63] Dessa forma, geralmente os estudos relativos às funções nutrigenômicas da vitamina D também descrevem interações nutrigenéticas. Em metanálise incluindo 42 indivíduos de diferentes etnias, a suplementação de vitamina D e a presença do alelo variante do polimorfismo BsmI (rs1544410) no VDR foram inversamente relacionadas ao risco de câncer colorretal.[64]

Em uma ampla revisão, incluindo estudos *in vitro, in vivo* e epidemiológicos, Balvers et al.[65] demonstraram papel importante da vitamina D, especialmente na redução da incidência do câncer colorretal. Os resultados de tais estudos permitiram concluir que indivíduos com concentrações séricas de 25-hidroxivitamina D3 [25(OH) D3] $\geq$ a 82 nmol/L tiveram incidência 50% menor de câncer colorretal do que aqueles com concentrações $\leq$ a 30 nmol/L. Sugeriu-se, ainda, que as concentrações séricas ideais de 25(OH)D3 dos 8 aos 64 anos de idade são de 50 nmol/L e, acima dos 65 anos, entre 75 e 100 nmol/L.

As ações protetoras da vitamina D foram investigadas em cultura de células de câncer de cólon (Caco-2 e HT-29) e depois em camundongos que receberam transplante dessas células. Nesse estudo, concluiu-se que o tratamento com 1,25$(OH)_2$D3 aumenta a expressão de E-caderina (molécula de adesão importante na manutenção da integridade dos colonócitos) e bloqueia a via da Wnt (criticamente ativada na carcinogênese). Tais efeitos foram acompanhados por aumento da expressão da *Dickkopf-related protein 1* (DKK-1), que contribuiu para um fenótipo diferenciado.[66]

Ácidos graxos ômega-3

Entre os ácidos graxos poli-insaturados da série ômega-3, destacam-se o alfa-linolênico (ALA – C18:3), cuja principal fonte alimentar é a linhaça; e o eicosapentaenoico (EPA – C22:5) e o docosaexaenoico (DHA – C24:6), encontrados principalmente em peixes de águas frias. Como as fontes nutricionais são escassas, nos últimos anos, popularizou-se a suplementação com cápsulas de ômega-3, especialmente em razão de suas alegações de propriedades benéficas para a saúde. Esses compostos foram relacionados com a redução do risco de alguns tipos de câncer, o que parece ter ligação com o efeito supressor sobre a produção de prostaglandina da série E2 (descrito em mais detalhes no Capítulo 10). O consumo de ômega-3 tem sido relacionado com a modulação da resposta inflamatória, a redução da proliferação celular, a indução da diferenciação e da apoptose, bem como com a supressão da angiogênese e de metástases.[67]

Uma metanálise de 21 estudos de coorte prospectivos, incluindo 20.905 casos e 883.585 controles, examinou a relação entre ômega-3 e o risco de câncer de mama. Os autores concluíram que a ingestão aumentada de ômega-3 de origem marinha (predominantemente EPA e DHA) reduz o risco desse tipo de câncer. Identificaram, ainda, uma associação de dose-resposta em que a cada 0,1 g/dia de ômega-3 de origem marinha consumido há redução de 5% do risco. Todavia, essa associação não foi observada em relação ao consumo de ALA.[68]

Além dos efeitos clássicos de ômega-3 na resposta inflamatória, a modulação de mecanismos biológicos e de vias metabólicas, incluindo a capacidade de modificar o metabolismo energético, tem sido proposta para explicar os benefícios de saúde associados ao consumo desse nutriente. Nesse sentido, o EPA e o DHA reduzem a expressão hepática de enzimas glicolíticas e lipogênicas, como a L-piruvato quinase (L-PK) e a ácido graxo sintase (FAS), por meio da redução da translocação nuclear da proteína de ligação ao elemento responsivo a carboidratos (ChREBP) (Figura 25.5). Essa informação é relevante, uma vez que células neoplásicas são capazes de reverter o metabolismo energético glicolítico para fosforilação oxidativa.[69]

Alterações metabólicas no metabolismo energético no câncer e as possíveis interações com os ácidos graxos ômega-3 foram revisadas por Manzi et al.[70] Os autores descrevem que, em células neoplásicas de mama tratadas com DHA, há diminuição das funções bioenergéticas com a concomitante redução de expressão e da atividade do fator induzido por hipóxia 1 alfa (HIF-1alfa). Relatam, ainda, que há redução de alvos de transcrição *downstream* do HIF-1alfa, como o transportador de glicose 1 (GLUT1) e a lactato desidrogenase (LDH). Os autores sugerem que a redução de HIF-1alfa induzida por DHA pode ocorrer por duas vias, detalhadas na Figura 25.6. A primeira hipótese é a de que o DHA induz a de-

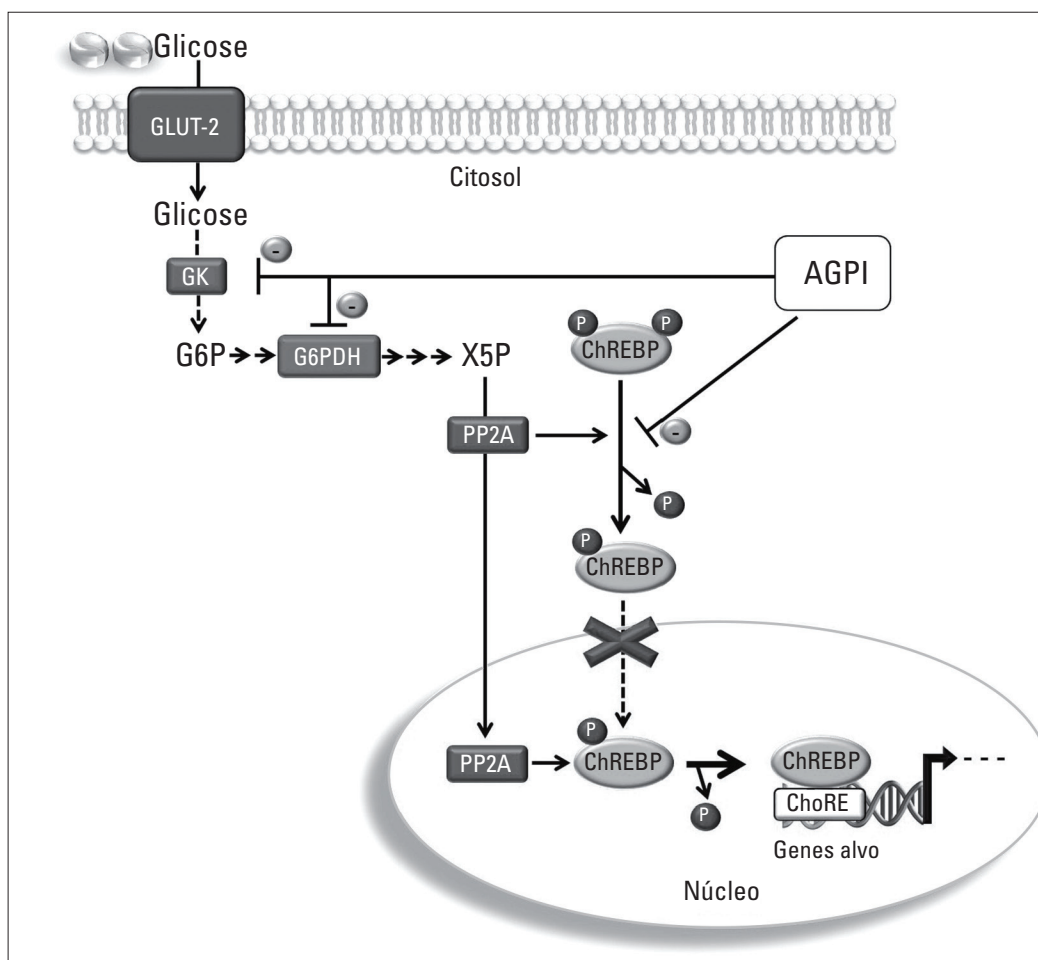



Figura 25.5 Efeito inibitório de ácidos graxos poli-insaturados na ativação e translocação do ChREBP. Em condições basais de baixas concentrações de insulina e glicose, o ChREBP está fosforilado no citosol de hepatócitos. Sua translocação para o núcleo é rapidamente induzida sob altas concentrações de glicose e insulina e é controlada por um mecanismo de desfosforilação e fosforilação. Enquanto a fosforilação do resíduo serina 196 (Ser196) permite a translocação do ChREBP para o núcleo, a desfosforilação do resíduo treonina 666 (Thr666) reduz a inibição da ligação ao DNA. Acredita-se que a proteína fosfatase 2A (PP2A), ativada seletivamente pela xilulose 5-fosfato (X5P), seja responsável pela desfosforilação citosólica e nuclear do ChREBP. O ChREBP então se liga ao seu elemento de resposta (ChoRE) para ativar a expressão de genes glicolíticos e lipogênicos. Na presença de ácidos graxos poli-insaturados, o ChREBP permanece retido no citosol por meio da inibição específica da atividade da glicoquinase e da glicose 6-fosfato desidrogenase, enzimas essenciais da glicólise e da via das pentoses fosfato, respectivamente. **Fonte:** adaptada de Dentin et al.[69]

gradação do HIF-1alfa por meio da ativação do receptor ativado por proliferação de peroxissomos alfa (PPAR-alfa), com consequente aumento da interação do HIF-1alfa com a proteína *Von Hippel-Lindau* (VHL), resultando em aumento da degradação via ubiquitina-proteassoma. O segundo mecanismo seria em razão de uma disfunção do complexo HSP90 (chaperonas necessárias ao enovelamento correto de proteínas, incluindo o HIF-1alfa).

Com relação ao tratamento de pacientes oncológicos, sugere-se que a adição de DHA e EPA purificados em fórmulas de nutrição parenteral para pacientes críticos com câncer do trato gastrintestinal seria benéfica, reduzindo a probabilidade do desenvolvimento de câncer colorretal e atuando na redução de complicações das terapias nutricionais atuais em pacientes que já apresentam a doença, incluindo alterações hepáticas. Entretanto, a utilização de fórmulas à base de óleo de peixe tem demonstrado resultados positivos na maioria, mas não em todos os estudos. Uma das possíveis explicações para isso relaciona-se à presença de contaminantes ambientais (como metais pesados) nos peixes de onde óleo foi extraído, ou de produtos de oxidação gerados por má conservação.[71]

EPIGENÔMICA NUTRICIONAL E CÂNCER

Eventos epigenéticos podem ser definidos como alterações estáveis e potencialmente herdáveis e reversíveis no genoma, que não alteram a sequência de nucleotídeos do DNA, porém interferem no padrão de expressão gêni-

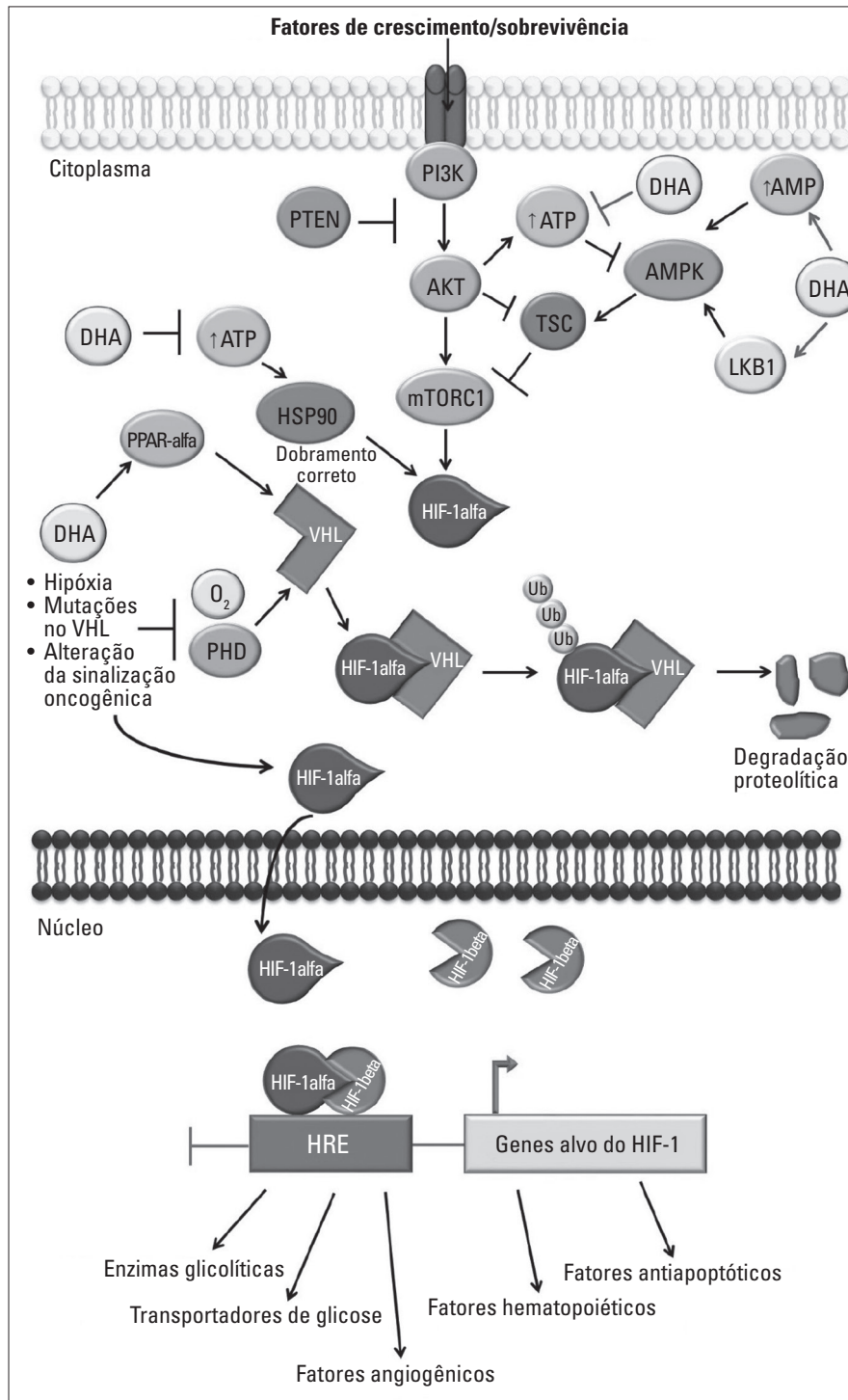



Figura 25.6 Ilustração esquemática do mecanismo pelo qual o ácido docosa-hexaenoico (DHA) pode interferir na sinalização molecular ao ativar o fenótipo glicolítico. A via PI3K-Akt-mTORC1 (*phosphoinositide 3-Kinase/protein Kinase B/mammalian target of rapamycin complex 1*) promove o fenótipo glicolítico, ativando principalmente o fator induzido por hipóxia 1-alfa (HIF-1alfa), o qual é ativado também por hipóxia, bem como por mutação de sua proteína reguladora VHL (*Von Hippel-Lindau*). O acúmulo de HIF-1alfa no citosol determina sua heterodimerização com a subunidade HIF-1beta, formando o complexo HIF-1 ativo, o qual regula positivamente diversos genes por meio da ligação aos elementos de resposta a hipóxia (HRE). O DHA interfere em vários pontos dessa via e tem a capacidade de atenuar a função bioenergética e o metabolismo de Warburg (glicólise aeróbia). O tratamento com DHA aumenta a expressão da proteína serina/treonina quinase 11 (LKB1) e as concentrações citosólicas de monofosfato de adenosina (AMP), eventos necessários para ativar a via da proteína quinase ativada por AMP 5' (AMPK). A ativação da AMPK inibe a sinalização da mTORC1 por meio da fosforilação da proteína TSC (*tuberous sclerosis protein*). Além disso, o DHA altera o metabolismo da célula de câncer por interferir nos processos envolvidos na estabilização do HIF-1alfa. De fato, a redução das concentrações citosólicas de ATP induzidas pelo DHA previnem o funcionamento adequado da HSP90 (*heat shok protein 90*), chaperona molecular necessária para o dobramento do HIF-1alfa. Ainda, o DHA desestabiliza o HIF-1alfa, promovendo sua degradação proteolítica por meio da ativação do receptor ativado por proliferação de peroxissomos alfa (PPAR-alfa). **Fonte:** adaptada de Manzi et al.[70]

ca. Esses eventos envolvem mecanismos de ativação ou silenciamento de genes por meio de modificações químicas no DNA ou na conformação e empacotamento da cromatina, dentre as quais as mais amplamente estudadas são a metilação do DNA e as modificações pós-traducionais em histonas, bem como os microRNA, descritos em detalhes no Capítulo 5. Sabe-se que a carcinogênese envolve alterações genéticas e epigenéticas complexas que interferem nos padrões de expressão gênica. Essas alterações ocorrem concomitantemente ao aumento da expressão e da atividade de oncogenes e à redução da expressão de genes supressores tumorais, o que pode envolver alterações epigenéticas.[11]

Conforme mencionado, modificações epigenéticas são reversíveis, herdáveis e suscetíveis a mudanças ao longo da vida. Por essa razão, o estudo desses aspectos pode auxiliar na compreensão de como os fatores ambientais, incluindo a alimentação, podem modificar o risco de desenvolvimento de câncer. Nutrientes como selênio e ácidos graxos, bem como CBA – incluindo polifenóis, retinoides, isotiocianatos, entre outros que apresentam capacidade antitumorigênica – têm sido relacionados com a modulação de mecanismos epigenéticos. Por interferir em eventos epigenéticos desregulados durante a carcinogênese, como a hipermetilação em região promotora de genes supressores de tumor e modificações carcinogênicas em histonas, esses compostos podem modular mecanismos relevantes para a redução do risco e supressão do câncer, incluindo vias de transdução de sinal, crescimento e diferenciação celular e apoptose.[72]

A metilação do DNA é catalisada por uma família de DNA metiltransferases (DNMT) que utiliza a S-adenosilmetionina (SAM) como doadora de radicais metil. A SAM é uma molécula gerada no ciclo da metionina e a sua disponibilidade é diretamente influenciada pela alimentação. O folato, as vitaminas B_{12}, B_6, a colina e a betaína são chamados de doadores de grupamentos metil e estão metabolicamente relacionados com a formação da metionina e com a sua conversão em SAM.[73] A redução da metilação global do DNA (hipometilação global), especialmente em sequências genômicas repetitivas, tem sido associada com instabilidade genômica e aberrações cromossômicas. Por outro lado, o aumento da metilação (hipermetilação do DNA) em regiões promotoras de genes supressores tumorais resulta em silenciamento transcricional. Ambas as alterações são relacionadas com a carcinogênese. Diferentemente da inativação de genes por deleções ou mutações *nonsense*, genes silenciados por metilação ainda permanecem intactos e podem ser reativados por CBA, que atuam como modificadores de mecanismos epigenéticos (Figura 25.7).[45]

A regulação epigenética da expressão gênica também é mediada por modificações pós-traducionais nas caudas N-terminais das histonas. Essas alterações são representadas por acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação, sumoilação e ribosilação e contribuem para a estabilidade genômica e a resposta a danos no DNA. Histonas podem ser modificadas por enzimas específicas, que incluem as acetilases (HAT), as desacetilases (HDAC), as metilases (HMT) e as desmetilases (HDM) de histonas. Sabe-se que HDAC apresentam atividade aumentada em tumores e que perturbações no equilíbrio dessas enzimas têm sido associadas com a transformação neoplásica. Componentes nutricionais apresentam a capacidade de modular a atividade de tais enzimas e, assim, de exercer atividades quimiopreventivas (Figura 25.8).[45]

Exemplos de CBA que atuam na modulação da atividade de HDAC incluem o butirato (ácido graxo de cadeia curta proveniente da fermentação das fibras solúveis), o dialil dissulfeto (CBA presente no alho e na cebola) e o sulforafano (CBA proveniente de glicorafarina, presente no brócolis). Esses compostos alteram a expressão de genes específicos, aumentando a expressão daqueles supressores tumorais e dos relacionados ao reparo do DNA. Os resultados das pesquisas experimentais sugerem que a contínua exposição a esses componentes bioativos dos alimentos é necessária para manter o controle dos mecanismos epigenéticos.[74]

Assim, com os avanços das pesquisas em genômica nutricional, torna-se cada vez mais clara a ideia de que a alimentação apresenta diferentes substâncias que, dependendo da frequência de ingestão e das concentrações, são capazes de modular os eventos epigenéticos envolvidos na carcinogênese.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A genômica nutricional auxilia a compreender como as interações entre genes e nutrientes podem modular as alterações genéticas e epigenéticas que promovem o aumento da expressão de genes supressores de tumor e de genes relacionados ao reparo de danos ao DNA, bem como a diminuição da expressão de oncogenes. A compreensão dos mecanismos moleculares de interação entre nutrição e câncer, proporcionados por técnicas avançadas de biologia molecular que compõem as ciências "ômicas", permitem a recomendação do consumo de ao menos quatro porções de frutas e hortaliças diárias para a redução do risco do desenvolvimento de câncer. Possibilitam ainda a identificação de genes e moléculas que podem ser modulados por nutrientes e CBA, o que pode auxiliar tanto a quimioprevenção quanto o tratamento do câncer. Entretanto, ainda são necessários mais estudos para que sejam definidas as recomendações de suplementos nutricionais baseadas em genótipos individuais.

Polifenóis do chá-verde*
Isoflavonas da soja*
Polifenóis de maçã e café
Antocianinas das *berries**
Partenolide*
Curcumina
Selênio
Isotiocianatos
Licopeno
Ácido nordi-hidroguaiarético
Butirato

Folato
Vitaminas do complexo B

Região promotora ilhas CpG
Sequências repetitivas
Éxon
RNAm
Tecido normal
DNMT
SAM
SAH
Hipermetilação do promotor
Hipometilação global
Éxon
Sem transcrição
Carcinogênese

Figura 25.7 Visão geral das alterações de metilação do DNA durante a carcinogênese e agentes quimiopreventivos do câncer inibindo a atividade da expressão das DNA metiltransferases (DNMT), prevenindo a hipermetilação aberrante ou a hipometilação global do genoma. A metilação do DNA é catalisada pelas DNMT com a S-adenosilmetionina (SAM) como substrato, gerando como produto a S-adenosilhomocisteína (SAH). *Compostos que apresentam atividade *in vivo*. **Fonte:** daptada de Gerhauser.[45]

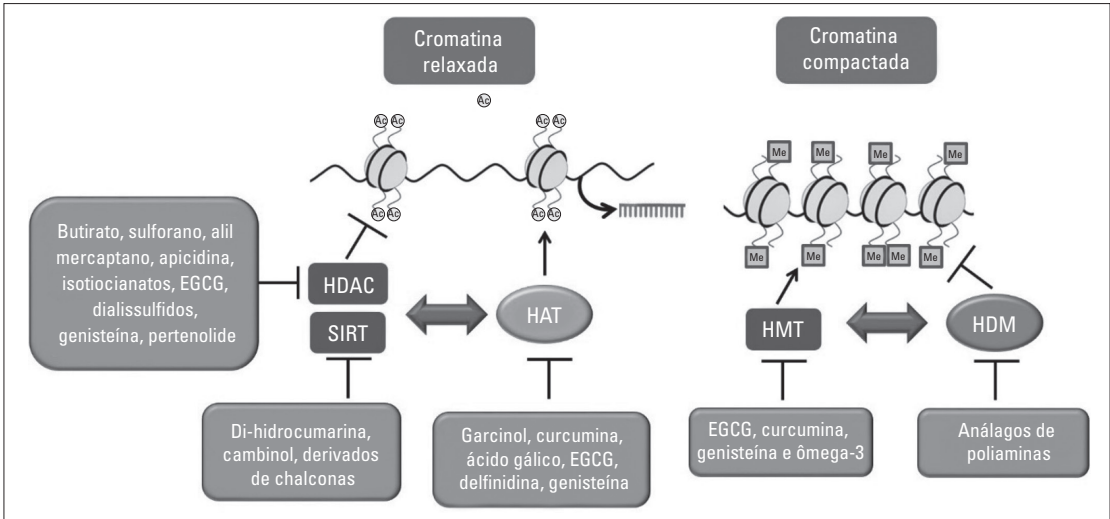



Figura 25.8 Visão resumida das enzimas modificadoras de histonas, com foco nas desacetilases de histonas (HDAC), nas histonas acetiltransferases (HAT), nas histonas metil-transferases (HTM) e nas desmetilases de histonas (HDM) e suas influências na estrutura da cromatina. Sirtuínas (SIRT) representam uma subclasse de HDAC NAD-dependentes. O efeito inibitório de compostos com ação quimiopreventiva também está ilustrado. **Fonte:** adaptada de Gerhauser.[45]

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Inca. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro; 2014.
2. Iarc. Nutrition and lifestyle: opportunities for cancer prevention. Lyon: Iarc Scientific Publications; 2002(156).
3. Greaves M. Cancer causation: the Darwinian downside of past success? Lancet Oncol. 2002;3(4):244-45.
4. Pitot HC, Dragan YP, Teeguarden J, Hsia S, Campbell H. Quantitation of multistage carcinogenesis in rat liver. Toxicol Pathol. 1996;24(1):119-28.
5. Feinberg AP, Cui H, Ohlsson R. DNA methylation and genomic imprinting: insights from cancer into epigenetic mechanisms. Semin Cancer Biol. 2002;12(5):389-98.
6. Smiraglia DJ, Smith LT, Lang JC, Rush LJ, Dai Z, Schuller DE, Plass C. Differential targets of CpG island hypermethylation in primary and metastatic head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). J Med Genet. 2003;40(1):25-33.
7. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. Cell. 2007; 128(4):683-92.
8. Ames BN, Gold LS, Willett WC. The causes and prevention of cancer. Proc Natl Acad Sci USA. 1995;92(12):5258-65.
9. Kim HJ, Choi WJ, Lee CH. Phosphorylation and reorganization of keratin networks: implications for carcinogenesis and epithelial mesenchymal transition. Biomol Ther (Seoul). 2015;23(4):301-12.
10. Magee PN, Farber E. Toxic liver injury and carcinogenesis. Methylation of rat-liver nucleic acids by dimethylnitrosamine in vivo. Biochem J. 1962;63:114-24.
11. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. Carcinogenesis. 2010;31(1):27-36.
12. Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. J Natl Cancer Inst. 1981;66(6):1191-308.
13. [WCRF/AICR] World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. Washington DC: AICR; 2007.
14. Wiseman M. The second World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research expert report. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. Proc Nutr Soc. 2008;67(3):253-56.
15. Kushi LH et al. American Cancer Society Guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. CA Cancer J Clin. 2012;62(1):30-67.
16. Nicastro HL, Trujillo EB, Milner JA. Nutrigenomics and cancer prevention. Curr Nutr Rep. 2012;1(1):37-43.
17. Guo Y, Su ZY, Kong AT. Current perspectives on epigenetic modifications by dietary chemopreventive and herbal phytochemicals. Curr Pharmacol Rep. 2015;1(4):245-57.
18. Hauser AT, Jung M. Targeting epigenetic mechanisms: potential of natural products in cancer chemoprevention. Planta Med. 2008;74(13):1593-601.
19. Simopoulos AP. Nutrigenetics/Nutrigenomics. Annu Rev Public Health. 2010;31:53-68.
20. Mathers JC. The biological revolution - towards a mechanistic understanding of the impact of diet on cancer risk. Mutat Res. 2004;551(1-2):43-49.
21. Li J, Xu W, Liu F, Huang S, He M. GSTM1 polymorphism contribute to colorectal cancer in Asian populations: a prospective me-ta-analysis. Sci Rep. 2015;5:12514.
22. Shen Y, Li D, Tian P, Shen K, Zhu J, Feng M et al. The catalase C-262T gene polymorphism and cancer risk: a systematic review and meta-analysis. Medicine (Baltimore). 2015;94(13):e679.
23. Zhou PT, Li B, Ji J, Wang MM, Gao CF. A systematic review and meta-analysis of the association between OGG1 Ser326Cys polymorphism and cancers. Med Oncol. 2015;32(2):472
24. Kelemen LE, Wang SS, Lim U, Cozen W, Schenk M, Hartge P, Li Y, Rothman N, Davis S, Chanock SJ, Ward MH, Cerhan JR. Vegetables- and antioxidant-related nutrients, genetic susceptibility, and non-Hodgkin lymphoma risk. Cancer Causes Control. 2008;19(5):491-503.
25. Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. Nat Rev Cancer. 2003;3(10):768-80.
26. Xue W, Warshawsky D. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. Toxicol Appl Pharmacol. 2005;206(1):73-93.
27. Nebert DW, Dalton TP, Okey AB, Gonzalez FJ. Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. J Biol Chem. 2004;279(23): 23847-50.
28. Wang H, Yamamoto JF, Caberto C, Saltzman B, Decker R, Vogt TM et al. Genetic variation in the bioactivation pathway for polycyclic hydrocarbons and heterocyclic amines in relationto risk of colorectal neoplasia. Carcinogenesis. 2011;32(2):203-9.
29. Fenech M, El-Sohemy A, Cahill L, Ferguson LR, French TA, Tai ES et al. Nutrigenetics and nutrigenomics: viewpoints on the current status and applications in nutrition research and practice. J Nutrigenet Nutrigenomics. 2011;4(2):69-89.
30. Shen Q, Tian Y, Li K, Jiang Q, Xue H, Yang S. Association of single nucleotide polymorphisms of DNA repair gene and susceptibility to pancreatic cancer. Int J Clin Exp Pathol. 2015;8(3):3180-5.
31. Fang J, Wang S, Zhang S, Su S, Song Z, Deng Y et al. Association of the glutathione s-transferase m1, t1 polymorphisms with cancer: evidence from ameta-analysis. PLoS One. 2013;8(11): e78707.
32. Economopoulos KP, Sergentanis TN. GSTM1, GSTT1, GSTP1, GSTA1 and colorectal cancer risk: a comprehensive meta-analysis. Eur J Cancer. 2010;46(9):1617-31.
33. Xu C, Chen S, Gao H, Zhao K, You X, Zhang Y et al. Quantitative assessment of the influence of glutathione S-transferase M1 null variant on ovarian cancer risk. J Cancer Res Ther. 2014;10 Suppl: C201-5.
34. Tse G, Eslick GD. Cruciferous vegetables and risk of colorectal neoplasms: a systematic review and meta-analysis. Nutr Cancer. 2014;66(1):128-39.
35. Lampe JW, Peterson S. Brassica, biotransformation and cancer risk: genetic polymorphisms alter the preventive effects of cruciferous vegetables. J Nutr. 2002;132:2991-94.
36. Hein DW, Fretland AJ, Doll MA. Effects of single nucleotide polymorphisms in human N-acetyltransferase 2 on metabolic activation (O-acetylation) of heterocyclic amine carcinogens. Int J Cancer. 2006;119(5):1208-11.
37. Nöthlings U, Yamamoto JF, Wilkens LR, Murphy SP, Park SY, Henderson BE et al. Meat and heterocyclic amine intake, smoking, NAT1 and NAT2 polymorphisms, and colorectal cancer risk in the

multiethnic cohort study. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2009;18(7):2098-106.
38. Ergul E, Sazci A, Utkan Z, Canturk NZ. Polymorphisms in the MTHFR gene are associated with breast cancer. Tumour Biol. 2003;24(6):286-90.
39. Amador AG, Righi PD, Radpour S, Everett ET, Weisberger E, Langer M, Eckert GJ, Christen AG, Campbell S Jr, Summerlin DJ, Reynolds N, Hartsfield JK Jr. Polymorphisms of xenobiotic metabolizing genes in oropharyngeal carcinoma. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2002;93(4):440-5.
40. Ichiba M, Maeta Y, Mukoyama T, Saeki T, Yasui S, Kanbe T, Okano J, Tanabe Y, Hirooka Y, Yamada S, Kurimasa A, Murawaki Y, Shiota G. Expression of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. Liver Int. 2003;23(5):338-45.
41. Sørensen M1, Raaschou-Nielsen O, Hansen RD, Tjønneland A, Overvad K, Vogel U. Interactions between the OGG1 Ser326Cys polymorphism and intake of fruit and vegetables in relation to lung cancer. Free Radic Res. 2006;40(8):885-91.
42. Cao M1, Mu X, Yang G, Chen H, Xue W. Single-nucleotide polymorphisms of GPX1 and MnSOD and susceptibility to bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. 2014;35(1):759-64.
43. Norat T, Scoccianti C, Boutron-Ruault MC, Anderson A, Berrino F, Cecchini M et al. European Code against Cancer 4th edition: Diet and cancer. Cancer Epidemiol. 2015;pii: S1877-7821(15)00070-3.
44. Turati F, Rossi M, Pelucchi C, Levi F, La Vecchia C. Fruit and vegetables and cancer risk: a review of southern European studies. Br J Nutr. 2015;113(Suppl 2):S102-10.
45. Gerhauser C. Cancer chemoprevention and nutriepigenetics: state of the art and future challenges. Top Curr Chem. 2013;329: 73-132.
46. Higdon JV, Delage B, Williams DE, Dashwood RH. Cruciferous vegetables and human cancer risk: epidemiologic evidence and me-chanistic basis. Pharmacol Res. 2007;55:224-36.
47. van Breemen RB, Sharifi R, Viana M, Pajkovic N, Zhu D, Yuan L et al. Antioxidant effects of lycopene in African American men with prostate cancer or benign prostate hyperplasia: a randomized, controlled trial. Cancer Prev Res (Phila). 2011;4(5):711-18.
48. Trejo-Solís C, Pedraza-Chaverrí J, Torres-Ramos M, Jiménez-Farfán D, Cruz Salgado A, Serrano-García N et al. Multiple molecular and cellular mechanisms of action of lycopene in cancer inhibition. Evid Based Complement Alternat Med. 2013;2013: 705121.
49. Hwang ES, Bowen PE. Effects of lycopene and tomato paste extracts on DNA and lipid oxidation in LNCaP human prostate cancer cells. BioFactors. 2005;23:97-105.
50. Lowe GM, Booth LA, Young AJ, Bilton RF. Lycopene and β-carotene protect against oxidative damage in HT29 cells at low concen-trations but rapidly lose this capacity at higher doses. Free Radic Res. 1999;30:141-51.
51. Jankun J, Selman SH, Swiercz R, Skrzypczak-Jankun E. Why drinking green tea could prevent cancer. Nature. 1997;387:561.
52. Ramshankar V, Krishnamurthy A. Chemoprevention of oral cancer: green tea experience. Journal of Natural Science, Biology and Medicine. 2014;5(1).
53. Shanmugam MK, Rane G, Kanchi MM, Arfuso F, Chinnathambi A, Zayed ME et al. The multifaceted role of curcumin in cancer prevention and treatment. Molecules. 2015;20(2):2728-69.
54. Gupta SC, Patchva S, Aggarwal BB. Therapeutic roles of curcumin: Lessons learned from clinical trials. AAPS J. 2013;15: 195-218.
55. Ying C, Hsu JT, Hung HC, Lin DH, Chen LF, Wang LK. Growth and cell cycle regulation by isoflavones in human breast carcinoma cells. Reprod Nutr Dev. 2002;42(1):55-64.
56. Davis CD, Milner JA. Nutrigenomics, vitamin D and cancer prevention. J Nutrigenet Nutrigenomics. 2011;4(1):1-11.
57. Díaz L, Díaz-Muñoz M, García-Gaytán AC, Méndez I. Mechanistic effects of calcitriol in cancer biology. Nutrients. 2015;7(6):5020-50.
58. Alimirah F, Peng X, Yuan L, Mehta RR, von Knethen A, Choubey D, Mehta RG. Crosstalk between the peroxisome proliferator--activated receptor γ (PPARγ) and the vitamin D receptor (VDR) in human breast cancer cells: PPARγ binds to VDR and inhibits 1α,25-dihydroxyvitamin D3 mediated transactivation. Exp Cell Res. 2012;318(19):2490-7.
59. Bikle DD, Teichert A, Arnold LA, Uchida Y, Elias PM, Oda Y. Differential regulation of epidermal function by VDR coactivators. J Steroid Biochem Mol Biol. 2010;121(1-2):308-13.
60. Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF, Lieben L, Mathieu C, Demay M. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. Endocr Rev. 2008;29(6):726-76.
61. Lamprecht SA, Lipkin M. Cellular mechanisms of calcium and vitamin D in the inhibition of colorectal carcinogenesis. Ann NY Acad Sci. 2001;952:73-87.
62. Norman AW, Bouillon R. Vitamin D nutritional policy needs a vision for the future. Exp Biol Med (Maywood). 2010;235(9):1034-45.
63. Chung I, Han G, Seshadri M, Gillard BM, Yu WD, Foster BA, Trump DL, Johnson CS. Role of vitamin D receptor in the antiproliferative effects of calcitriol in tumor-derived endothelial cells and tumor angiogenesis in vivo. Cancer Res. 2009;69(3):967-75.
64. Touvier M, Chan DS, Lau R, Aune D, Vieira R, Greenwood DC et al. Meta-analyses of vitamin D intake, 25-hydroxyvitamin D status, vitamin D receptor polymorphisms, andcolorectal cancer risk. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2011;20(5):1003-16.
65. Balvers MG, Brouwer-Brolsma EM, Endenburg S, de Groot LC, Kok FJ, Gunnewiek JK. Recommended intakes of vitamin D to optimise health, associated circulating 25-hydroxyvitamin D concentrations, and dosing regimens to treat deficiency: workshop report and overview of current literature. J Nutr Sci. 2015;4:e23.
66. Aguilera O, Peña C, García JM, Larriba MJ, Ordóñez-Morán P, Navarro D et al. The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is induced by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 associated to the differentiation of human colon cancer cells. Carcinogenesis. 2007;28(9):1877-84.
67. Nabavi SF, Bilotto S, Russo GL, Orhan IE, Habtemariam S, Daglia M et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cancer: lessons learned from clinical trials. Cancer Metastasis Rev. 2015;34(3): 359-80.
68. Zheng JS, Hu XJ, Zhao YM, Yang J, Li D. Intake of fish and marine n-3 polyunsaturated fatty acids and risk of breast cancer: meta-analysis of data from 21 independent prospective cohort studies. BMJ. 2013;346:f3706.
69. Dentin R, Benhamed F, Pégorier JP, Foufelle F, Viollet B, Vaulont S et al. Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation. J Clin Invest. 2005;115(10):2843-54.
70. Manzi L, Costantini L, Molinari R, Merendino N. Effect of dietary ω-3 polyunsaturated fatty acid DHA on glycolytic enzymes and warburg phenotypes in cancer. Biomed Res Int. 2015;2015: 137097.

71. Ferguson LR. Fish oils in parenteral nutrition: Why could these be important for gastrointestinal oncology? World J Gastrointest Oncol. 2015;7(9):128-31.
72. Mathers JC. Session 2: personalised nutrition. Epigenomics: a basis for understanding individual differences? Proc Nutr Soc. 2008;67(4):390-94.
73. Yang CS et al. Reversal of hypermethylation and reactivation of genes by dietary polyphenolic compounds. Nutr Rev. 2008;66(Suppl 1):S18-20.
74. Dashwood RH, Ho E. Dietary histone deacetylase inhibitors: from cells to mice to man. Semin Cancer Biol. 2007;17(5):363-69.

26 Vírus da imunodeficiência humana

Ricardo Sobhie Diaz
Maria Aderuza Horst

INTRODUÇÃO

Desde as primeiras descrições sobre a síndrome da imunodeficiência adquirida (Aids), já eram relatadas suas graves consequências decorrentes das profundas alterações no sistema imune do indivíduo acometido pela doença. Inicialmente, observava-se que as pessoas infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e que desenvolviam Aids evoluíam a óbito em razão de infecções oportunistas e de neoplasias raras, as quais, subsequentemente, foram também denominadas neoplasias oportunistas. No momento do diagnóstico das doenças oportunistas, detectava-se sistematicamente a diminuição da imunidade celular (sem o envolvimento de anticorpos). Em um segundo momento, quando o desenvolvimento de testes sorológicos permitiu o diagnóstico mais precoce da infecção pelo HIV, percebeu-se que a perda da imunidade celular, que era determinada pelas quantidades de linfócitos T CD4+, ocorria de forma paulatina e progressiva.

A doença é, portanto, um processo crônico, quase sempre lento e inexorável, que compromete a imunidade celular, culminando com a morte do indivíduo infectado.[1] Entretanto, percebeu-se desde o início que essa regra tinha exceções. Algumas pessoas infectadas pelo HIV apresentavam progressão do déficit de imunidade de forma muito lenta; em outras, isso acontecia de maneira muito acelerada. Na busca pelo entendimento sobre o que ditaria a velocidade de progressão da doença, evidenciado pelo ritmo de decaimento dos linfócitos T CD4+, ficou determinado que o fator que mais se correlacionava com tal redução eram os níveis de replicação do HIV, ou seja, a carga viral.[2] A equação parecia finalizada: a infecção pelo vírus HIV promove a progressão da doença de forma direta em razão do seu papel citopático e, quanto mais intensa a replicação viral, mais rapidamente ocorre o decaimento dos linfócitos T CD4+. As condutas para intervenção em momentos de risco, como instituição de profilaxias primárias para infecções oportunistas ou início de tratamento com antirretrovirais, era ditada exclusivamente pelas contagens sanguíneas de linfócitos CD4+.

A infecção pelo HIV é considerada uma zoonose, ou seja, uma infecção originária de animais que é transmitida ao ser humano em condições naturais. O HIV que infecta humanos evoluiu a partir de retrovírus similares, os vírus da imunodeficiência símia (SIV), que causam Aids em macacos. O SIV está presente em macacos há muito mais tempo, e uma das evidências disso está no fato desse vírus estar mais adaptado aos símios que o HIV aos seres humanos; em outras palavras, o SIV não mata o seu hospedeiro natural, o macaco. Um resultado interessante consistiu na observação de que o SIV_{SM}, vírus originário do macaco conhecido como mangabeu fuligento (*sooty mangabey*), infecta incidentalmente outros símios em laboratório, como o macaco *rhesus*. Este último, que não é o hospedeiro natural do SIV_{SM}, evolui rapidamente para óbito. Conforme mostra a Figura 26.1, a única diferença entre os dois macacos com relação aos marcadores virológicos e imunológicos da doença foram os níveis de ativação celular (ativação dos linfócitos T CD4+ e T CD8+).[1] O hospedeiro incidental e menos adaptado ao vírus apresenta grande dificuldade de repor os linfócitos T CD4+ destruídos. Sendo assim, estabeleceu-se que não é somente o vírus que se correlaciona com a progressão da Aids.

INFECÇÃO POR HIV E ATIVAÇÃO CELULAR

A exemplo do que ocorre em macacos, a ativação das células T CD4+ e CD8+ apresenta-se elevada também em seres humanos infectados pelo HIV.[3] A ativação celu-

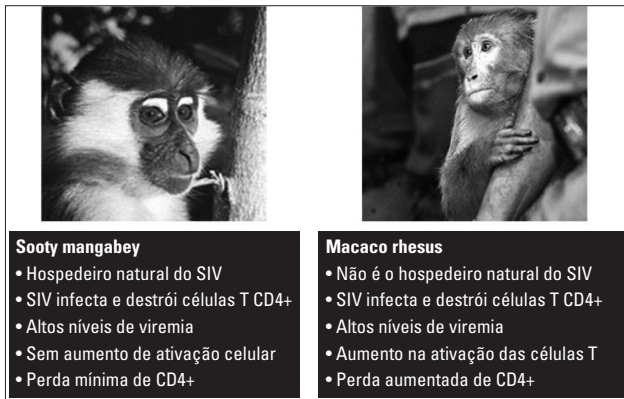



Figura 26.1 Diferenças entre marcadores virológicos e imunológicos em macacos de diferentes espécies infectados com o vírus da imunodeficiência símia (SIV), determinando a evolução da doença. CD4+: linfócitos CD4+. **Fonte:** adaptada de Sodora e Silvestri.[1]

lar denota indiretamente um processo inflamatório que, entre outros aspectos, correlaciona-se com a morte celular, especialmente a morte celular programada ou apoptose.[4] A ativação celular não só está aumentada nas pessoas infectadas pelo HIV em comparação com as não infectadas, como também é proporcional aos níveis de carga viral na ausência de tratamento antirretroviral. Em outras palavras, como visto na Figura 26.2, quanto maior a carga viral, maiores os níveis de ativação celular.[5,6]

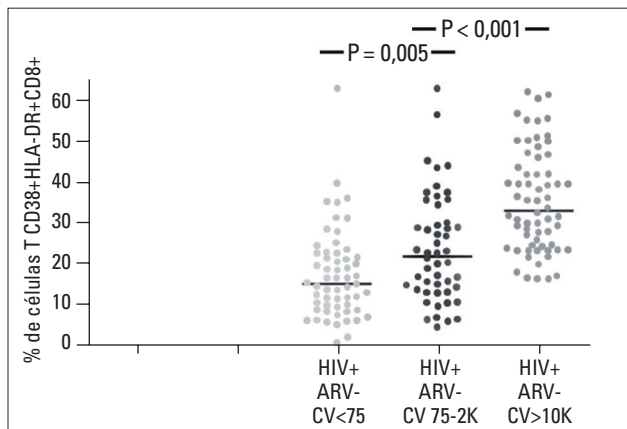



Figura 26.2 Ativação celular de linfócitos T e carga viral (CV) entre pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV+) e não tratados com antirretrovirais (ARV–). **Fonte:** adaptada de Hunt et al.[6]

Os mecanismos ligados ao desenvolvimento do processo inflamatório deletério relacionam-se intrinsecamente com a depleção de linfócitos T CD4+ presentes no trato gastrintestinal.[7] Após a exposição ao HIV, o vírus é captado por uma célula dendrítica que, sem se infectar por ele, o transporta ao linfonodo regional para que seja deflagrada a assim chamada resposta imune adaptativa,[8] o que ocorre a despeito da via de exposição ao HIV. Esse tráfego tem duração variável de 4 a 14 dias. A infecção dos linfócitos iniciará nesse linfonodo regional e, posteriormente, uma quantidade enorme de vírus será lançada na circulação sanguínea. Esses vírus livres presentes no plasma serão replicados em órgãos linfoides e se concentrarão especialmente no trato gastrintestinal, uma vez que o intestino é o maior órgão linfoide do corpo humano, contendo mais de 50% dos linfócitos do organismo.[7]

A depleção linfocitária no organismo é intensa no início da infecção, mas a magnitude da perda de linfócitos não pode ser determinada pela observação da contagem de CD4+ presente no sangue periférico. Somente cerca de 3% dos linfócitos T CD4+ encontram-se na corrente sanguínea periférica, e a determinação da contagem de CD4+ não prediz a variação da perda do contingente dessas células que está ocorrendo, especialmente no trato gastrintestinal. A repercussão mais imediata dessa depleção linfocitária no trato gastrintestinal é a ruptura da barreira mucosa associada à presença de translocação bacteriana, ou seja, a invasão de bactérias nos espaços que deveriam conter os tecidos linfoides.[7] A translocação bacteriana possibilita a transferência de lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano à corrente sanguínea, o que ocasiona um processo inflamatório generalizado e, especificamente, o aumento da ativação de células de defesa.[9] De fato, existe uma correlação positiva direta entre as altas concentrações plasmáticas de LPS com o grau de ativação celular.[7]

De forma geral, os níveis mais elevados de ativação celular são detectados entre indivíduos sem tratamento e portadores de vírus sensíveis aos medicamentos. Os controladores de elite, que são pessoas que apresentam naturalmente carga viral indetectável e estabilidade de CD4+, apresentam menores índices de ativação celular do que os indivíduos com alta viremia, porém os níveis de ativação celular entre os indivíduos tratados e com carga viral indetectável são inferiores aos dos controladores de elite. De qualquer maneira, mesmo o tratamento antirretroviral, que resulta na supressão da viremia a níveis indetectáveis, não reduz a ativação celular até o nível das pessoas não infectadas pelo HIV. Em resumo, a ativação celular é maior de acordo com a seguinte ordem: indivíduos infectados por HIV com vírus sensíveis e sem tratamento > indivíduos com viremia baixa e em tratamento antirretroviral > controladores de elite > indivíduos HIV+ com antirretrovirais e carga viral indetectável > indivíduos não infectados por HIV.[1,10]

De forma mais específica, quanto maior a ativação celular entre pessoas em tratamento com carga viral indetectável, maior a dificuldade na recuperação das contagens de CD4+ (Figura 26.3). Especula-se, portanto, que a ativação celular elevada dificulte a recuperação imunológica plena em alguns pacientes.

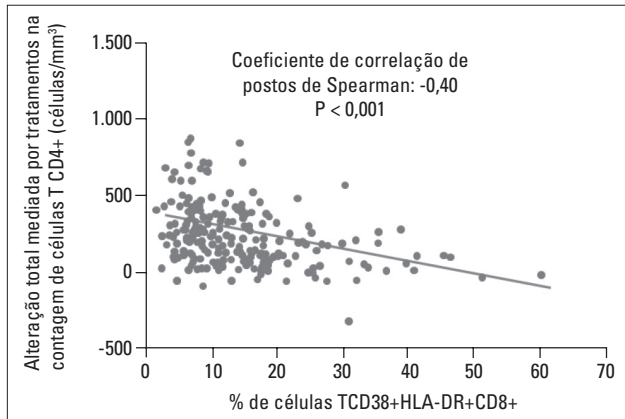



Figura 26.3 Ativação celular e aumento de células CD4+ durante tratamento antirretroviral. **Fonte:** adaptada de Hunt et al.[5]

CONSEQUÊNCIAS DA INFECÇÃO PELO HIV NOS SERES HUMANOS

A infecção por HIV pode ocasionar um quadro de inflamação crônica de baixo grau que, em longo prazo e de maneira geral, pode resultar em deterioração de diversos órgãos e tecidos do organismo. No sistema nervoso central (SNC), é possível ocorrer atrofia encefálica com aparecimento de alterações cognitivas e depressão. Pode haver também prejuízo do sistema cardiovascular com ocorrência de fenômenos ateroscleróticos, insuficiência coronariana e disfunção ventricular esquerda. Outras consequências incluem a osteopenia, com presença de fraturas ósseas, a deterioração da função hepática e renal e a insuficiência endócrina múltipla.[11] Estudos indicam que o tratamento antirretroviral mitiga, mas não elimina os riscos dessas ocorrências. Mesmo com níveis de carga viral mantidos indetectáveis, os eventos clínicos citados anteriormente ocorrem com maior frequência entre as pessoas infectadas pelo HIV em comparação à população soronegativa.[12-20]

Corroborando a associação entre a inflamação crônica e a infecção pelo HIV, marcadores inflamatórios inespecíficos, como proteína C reativa (PCR) ultrassensível, interleucina 6 (IL-6) e dímero D, estão elevados em indivíduos infectados pelo HIV e correlacionam-se diretamente com a gravidade da doença quando desfechos como mortalidade são considerados.[21] Embora o tratamento farmacológico que resulta em supressão viral a níveis indetectáveis reduza as concentrações plasmáticas de tais marcadores inflamatórios, estes continuam elevados quando comparados aos dos indivíduos não infectados pelo HIV.[22]

VARIAÇÕES GENÉTICAS E PROGRESSÃO DA AIDS

Existe um grande interesse da comunidade científica em entender a relação entre a progressão da Aids após a infecção do indivíduo pelo HIV. Na maioria dos casos, não se identifica por que alguns indivíduos apresentam ritmo de progressão mais lento; entretanto, alguns trabalhos sugerem que fatores genéticos do hospedeiro possam estar envolvidos. Entre as variações genéticas relacionadas à progressão mais lenta da doença, destacam-se os polimorfismos nos genes que determinam a conformação dos antígenos leucocitários humanos (HLA) B*57-01 ou B*27, especificamente o alelo A do polimorfismo G801A (rs1801157) no gene que codifica o fator 1 derivado do estroma (SDF1) e os polimorfismos de deleção de 32 (delta32) e inserção de 64 pares de base nos genes que codificam os receptores de quimiocina 5 (CCR5) e 2 (CCR2-64I), respectivamente.[23-27]

Existe uma relação entre CCR5-delta32, a progressão da doença e a inflamação crônica. Estima-se que cerca de 1% dos caucasianos apresentem homozigose para o CCR5-delta32, condição associada à resistência à infecção pelo HIV, em decorrência da ausência da expressão do receptor CCR5 na superfície celular, o qual é fundamental para a entrada do vírus na célula.[28-30] Aproximadamente 15% dos indivíduos apresentam CCR5-delta32 em heterozigose[31] e não estão completamente protegidos da infecção pelo HIV; entretanto, notadamente, apresentam ritmo de progressão da doença mais lento quando comparados aos indivíduos que carreiam os dois alelos selvagens (Figura 26.4).[27,32,33] Para compreensão do mecanismo diferenciado de progressão da doença entre os

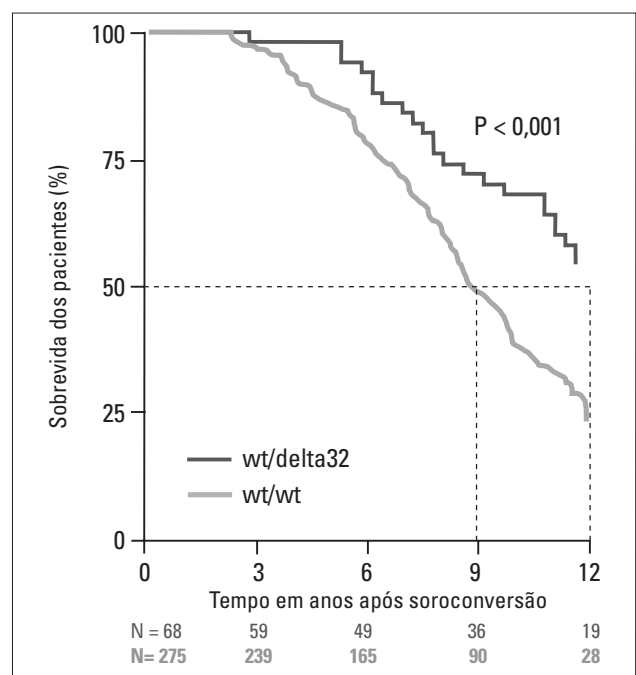



Figura 26.4 Sobrevida de pacientes infectados com HIV carreadores do polimorfismo de deleção de 32 nucleotídeos no CCR5 em heterozigose (wt/delta32) e dos não carreadores (wt/wt). **Fonte:** adaptada de Roda Husman et al.[34]

indivíduos heterozigotos para o alelo CCR5-delta32, é necessária a explanação sobre a função do CCR5 e a repercussão da ausência ou diminuição da expressão desses receptores na superfície das células.

O CCR5 é um receptor de quimiocinas fundamental para a entrada do HIV nas células. Algumas atividades pró-inflamatórias do organismo são inteiramente dependentes do receptor CCR5, que é determinante para o tráfego de leucócitos para o SNC. Foi observada redução da quantidade de leucócitos, de células *natural killer* e de células T no cérebro de camundongos *knockout* para o CCR5 em comparação com animais que apresentavam o receptor.[35]

O potencial anti-inflamatório da ausência ou da diminuição da expressão de CCR5 é notório. Percebeu-se, inicialmente, que a inibição do CCR5 em camundongos preveniu o aparecimento de artrite reumatoide grave.[36] De forma geral, o alelo CCR5-delta32 em humanos associa-se à proteção contra o desenvolvimento de artrite reumatoide, bem como à redução dos sintomas quando ocorre a manifestação dessa doença.[37] Outras evidências do benefício relacionado à redução do dano mediado pelo sistema imune nos carreadores do alelo CCR5-delta32 incluem a redução dos índices de rejeição de transplantes renais,[38] o retardo no desenvolvimento de esclerose múltipla,[39] a redução da incidência de linfoma relacionado a Aids[40] e a redução da inflamação e do dano hepático proporcionado pelo vírus da hepatite C.[41]

Em resumo, a diminuição da expressão de receptores CCR5 causada pelo alelo CCR5-delta32 promove redução da capacidade inflamatória em seus carreadores. Sabe-se também que esses indivíduos, quando infectados pelo HIV, apresentam progressão mais lenta da doença por apresentarem ritmo de decaimento de linfócitos T CD4+ reduzido. Portanto, é concebível que a diminuição da resposta pró-inflamatória em indivíduos com menor quantidade de receptores CCR5 nas suas células seja o determinante fundamental na preservação das células T CD4+ em infectados pelo HIV (Figura 26.5).

Outro fator relacionado à progressão mais lenta da infecção pelo HIV está na coinfecção com o vírus da hepatite G (GBV-C). Trata-se de um vírus hepatotrópico que não causa doença ao hospedeiro e, em combinação com o HIV, resulta em menor ritmo de progressão da Aids.[42] Contudo, o mecanismo que determina esse benefício ainda não é completamente elucidado. Determinou-se que o GBV-C causa regulação negativa na expres-

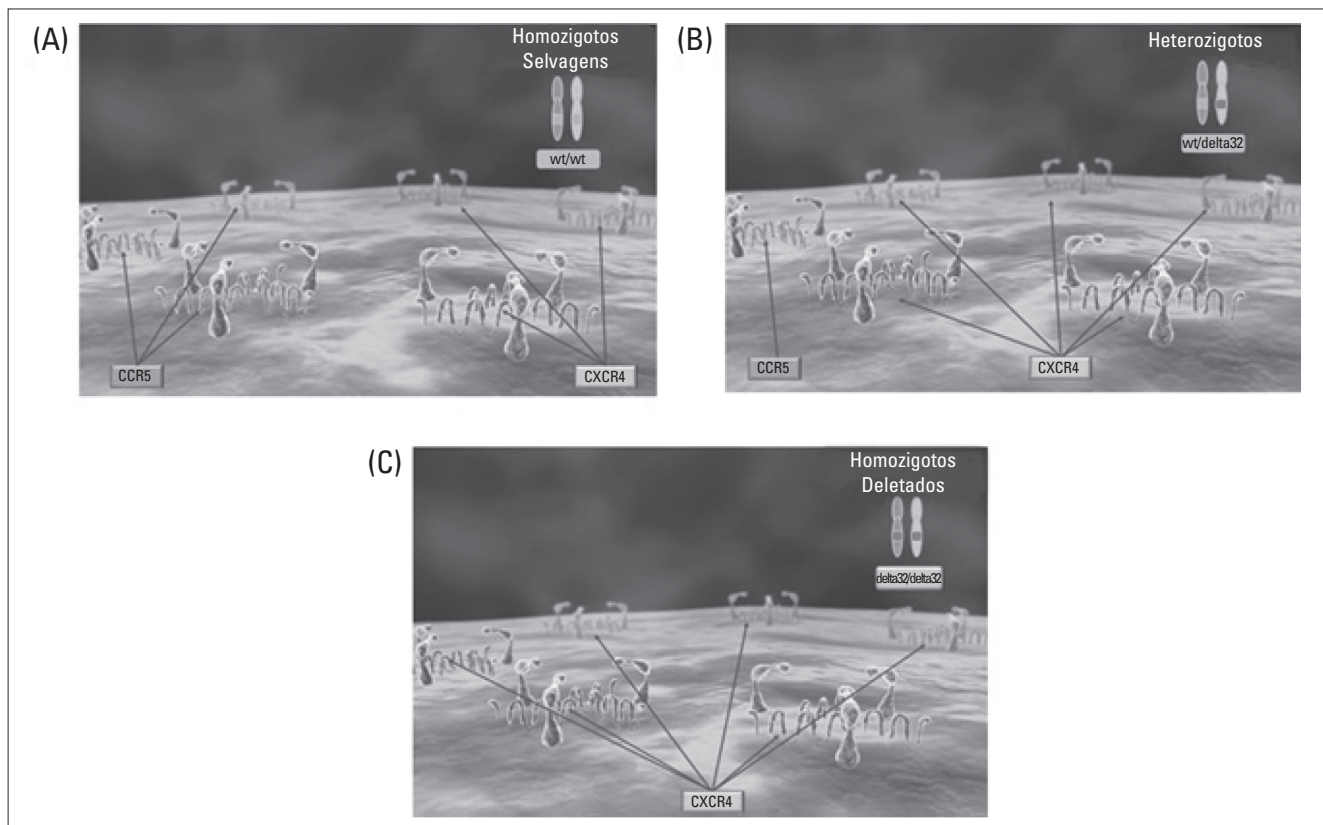



Figura 26.5 Desenho esquemático da proporção de receptor de quimiocina 5 (CCR5) e de receptor de quimiocina C-X-C tipo 4 (CXCR4) na superfície celular (linfócitos T CD4+) de acordo com o polimorfismo do CCR5. (A) Presença dos dois alelos selvagens (wt/wt) que codificam o CCR5. (B) Um alelo normal e um alelo com deleção de 32 nucleotídeos (wt/delta32). (C) Dois alelos com deleção de 32 nucleotídeos (delta32/delta32).

são dos receptores CCR5, diminuindo o número desses receptores na superfície celular.[43] Dessa forma, indivíduos infectados por GBV-C responderiam (artificialmente) como se apresentassem o alelo CCR5-delta32.

EFEITO DO TRATAMENTO ANTIRRETROVIRAL NA INFLAMAÇÃO

Como mencionado anteriormente, a redução na viremia proporcionada pelo tratamento antirretroviral diminui a ativação celular. O mecanismo envolvido nesse processo é o da diminuição da translocação bacteriana, com consequente redução das concentrações plasmáticas de LPS e, possivelmente, menor efeito antigênico da viremia *per se*. Sabe-se que proteínas virais, como proteína transativadora 1 (TAT) ou proteína viral R (VPR), podem causar intenso processo inflamatório em tecidos humanos.[44-46] Considerando que a estabilidade da mucosa intestinal é fundamental para o controle do processo inflamatório exacerbado, um estudo recrutou 340 pessoas infectadas pelo HIV com contagem elevada de células T CD4+ e sem programação de início de tratamento com antirretrovirais. Esses pacientes foram alocados em dois grupos, um dos quais recebeu uma barra de cereal para consumo diário contendo suplementação com formulação de oligossacarídeos prebióticos, N-acetilcisteína, colostro bovino, ômega-3, ácidos graxos poli-insaturados, vitaminas, sais minerais e carotenoides, e o outro recebeu uma barra de cereais sem suplementos (placebo). Após 52 semanas de acompanhamento, a redução na contagem das células T CD4+ foi superior no grupo que recebeu placebo (–68 células mm^3) em comparação ao grupo que recebeu o suplemento (–28 células/mm^3) ($p = 0,03$). Além disso, em uma subpopulação desse estudo em que a ativação celular foi avaliada, demonstrou-se que ela foi inferior no grupo tratado ($p < 0,05$), o que demonstra que intervenções nutricionais podem contribuir para a diminuição da resposta pró-inflamatória proporcionada pelo HIV e do ritmo de progressão da doença.[47]

Além disso, é interessante destacar dados emergentes demonstrando que a inibição do CCR5 de forma artificial promove valor aditivo na resposta imunológica proporcionada pelo tratamento. Cabe ressaltar que o incremento de CD4+ em pessoas com heterozigose para CCR5-delta32 é superior ao das pessoas que apresentam os dois alelos selvagens.[48] Da mesma forma, a resposta ao tratamento antirretroviral propiciou maior aumento de CD4+ entre pessoas coinfectadas pelo GBV-C, e nesse estudo não foram utilizados antagonistas de CCR5.[49] Além disso, indivíduos coinfectados com HIV e GBV-C apresentam menor ativação celular que aqueles com infecção apenas pelo HIV.[50]

Sugere-se que seja possível reverter a situação de indivíduos com falha imunológica. Avanços científicos recentes demonstraram ser plausível promover *knockout* permanente do CCR5 em células hematopoiéticas. Por meio da manipulação genética usando enzimas conhecidas como *zinc finger nucleases*, é possível a eliminação de fragmentos do gene que codifica o CCR5, o que resulta em não expressão do receptor em camundongos.[51] Em um estudo piloto em humanos, foram incluídos seis voluntários do sexo masculino infectados há mais de 20 anos e sob tratamento antirretroviral. Esses indivíduos apresentavam contagem de CD4+ entre 200 e 500 células e carga viral indetectável. Eles foram submetidos à citoferese e, posteriormente, as suas células sanguíneas foram submetidas à ação enzimática *in vitro* de *zinc finger nucleases*. Nesse procedimento são eliminados quatro nucleotídeos do gene que codifica o CCR5, resultando na ausência de expressão desse gene na superfície das células, à semelhança do que ocorre naturalmente entre indivíduos homozigotos para o alelo delta32. A nova linhagem celular foi chamada de SB-728, e cada paciente teve as suas próprias células modificadas reinjetadas na circulação sanguínea. Cinco dos seis indivíduos apresentaram aumento substancial de CD4+ (em média de 200 células), persistente um ano após o procedimento.[52] Esses resultados confirmam de forma indireta o papel da redução da inflamação no benefício imunológico dos pacientes infectados pelo HIV.

GENÔMICA NUTRICIONAL E HIV

As interações entre genes e nutrientes ainda são pouco exploradas em indivíduos com HIV. Entretanto, a alimentação adequada é determinante na resposta ao tratamento, pois desempenha papel fundamental em todos os aspectos do metabolismo, segurança e eficácia de fármacos, especialmente com relação às terapias antirretrovirais, as quais têm assumido posição de destaque nos cuidados e no tratamento de pacientes com HIV, bem como na prevenção de comorbidades.[53]

O estado nutricional do paciente também é importante no prognóstico da Aids, sendo a anemia ferropriva uma manifestação comum de infecção pelo HIV e um significante fator preditivo negativo para sobrevida.[54] Sabe-se que a concentração de hemoglobina isoladamente não reflete a concentração de ferro nos tecidos ou o estado nutricional global relativo ao mineral, pois em todos os tipos de infecção ocorre drástica redistribuição corporal do ferro, como resultado da resposta de fase aguda. Assim, o estado nutricional do indivíduo em relação ao

ferro pode ser interpretado como deficiente ou adequado, dependendo do biomarcador avaliado. Nesse sentido, concentrações plasmáticas elevadas de transferrina e de ferritina foram associadas à mortalidade e ao aumento da carga viral, com aumento da virulência, predisposição a infecções oportunistas e alterações da resposta imune.[55]

Coletivamente, as evidências de que a homeostase e o metabolismo do ferro desempenham papel importante na progressão da infecção pelo HIV são fortes e trazem implicações práticas na interpretação clínica e no controle do estado nutricional do indivíduo em relação ao ferro e de anemia em pacientes HIV+. Como descrito em detalhes no Capítulo 14, o metabolismo e a homeostase do ferro em humanos é dependente do transportador de metal divalente (DMT1) ou do SLC11A [*solute-linked carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporter)*]. Tais evidências despertaram a atenção dos pesquisadores, e um dos poucos trabalhos publicados sobre nutrigenética e HIV diz respeito a anemia e polimorfismos em genes relacionados ao metabolismo e à homeostase do ferro, investigados em 1.362 pacientes HIV+ adultos africanos de ambos os sexos. Entre os principais resultados, foram encontrados tanto genótipos de proteção (rs3731865) quanto relacionados ao aumento do risco de mortalidade (rs34448891, rs17235409 e rs17229009) no gene *SLC11A*. Os autores sugerem a relevância de tais marcadores ao serem considerados fatores de confusão na determinação do estado nutricional do indivíduo em relação ao ferro. Demonstraram ainda que, apesar de o escore de risco genético aparentemente resultar em risco progressivo de mortalidade, com interação significativa ($p = 0,018$), as conclusões específicas de cada categoria (baixo, médio ou alto risco genético) foram limitadas pelo número restrito de voluntários.[56] Esses dados são interessantes, pois alertam para a necessidade de cuidado nutricional individualizado aos indivíduos HIV+ e que apresentem polimorfismos em genes relacionados ao metabolismo do ferro.

Intervenções nutricionais, particularmente a suplementação de vitaminas, têm potencial para serem estratégias adjuvantes de baixo custo para pacientes com HIV, em virtude do seu potencial na modulação do sistema imune. A vitamina A tem sido mais exaustivamente estudada, apresentando resultados contraditórios. A maioria dos estudos observacionais descreve que baixas concentrações plasmáticas de vitamina A estão associadas com o aumento do risco de transmissão do HIV de mãe para filho.[57] Todavia, essa conclusão não foi sustentada por grandes ensaios randomizados de suplementação de vitamina A; pelo contrário, esses ensaios revelaram que a suplementação de vitamina A aumenta o risco de transmissão do HIV da mãe para filho (transmissão vertical), de acordo com uma revisão sistemática, incluindo 4 estudos e 2.800 mulheres.[58] Posteriormente, outra revisão sistemática incluindo 7.528 mulheres chegou à conclusão de que não há evidências de que a suplementação pré ou pós-natal influencia o risco de transmissão do HIV de mãe para filho.[59] Há uma série de mecanismos moleculares aventados para explicar esses resultados contraditórios. Um deles é a questão da causalidade reversa em estudos observacionais. Por exemplo, o estágio avançado da doença pode suprimir a liberação de vitamina A do fígado, o que resultaria em baixas concentrações plasmáticas de vitamina A, embora essa vitamina seja estocada no fígado. Além disso, o genoma do HIV apresenta elementos de resposta para o receptor de ácido retinoico (RAR), que, quando ativado pela interação com a vitamina A, atua como fator de transcrição, induzindo a replicação do HIV e aumentando, assim, o risco de transmissão do vírus para o filho pelo aumento da carga viral da mãe. Outro mecanismo baseia-se no potencial de indução da diferenciação das células linfoides pela vitamina A, o que promove aumento nos receptores CCR5, elevando o ritmo de decaimento de linfócitos T CD4+.[60]

Outro nutriente importante no contexto do HIV é a vitamina D. Sabe-se que essa vitamina está associada com diversas funções fisiológicas e imunomoduladoras e que sua deficiência está associada com uma gama de doenças, bem como com a progressão e a mortalidade por HIV/Aids.[61] Para identificar a influência da suplementação oral de vitamina D3, 104 indivíduos sul-africanos de ambos os sexos infectados com HIV e 100 controles foram suplementados semanalmente com cápsulas contendo 50.000 UI, durante seis semanas, no período do inverno. Observou-se que a suplementação oral de vitamina D3 atenuou a taxa de replicação do HIV, aumentou a concentração de leucócitos circulantes e inverteu a baixa concentração plasmática de 25(OH)D observada no inverno. Os autores concluíram que essa pode ser uma suplementação de baixo custo capaz de melhorar a imunidade em indivíduos com HIV.

Cabe destacar, ainda, que variações genéticas em genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo da vitamina D podem influenciar a resposta do indivíduo à suplementação. Nesse contexto, os autores avaliaram o genótipo dos participantes para dez polimorfismos: *DBP* (rs7041 e rs4588), DHCR7 (7-DCH redutase – rs12785878), CYP2R1 (vitamina D 25-hidroxilase – rs10741657), CYP24A1 (vitamina D 24-hidroxilase – rs6013897), CYP27B1 (vitamina D 1alfa-hidroxilase – rs10877012) e VDR (rs2544037, rs10783219, rs10735810 e rs731236). Apesar do tamanho reduzido da amostra, polimorfismos de nucleotídeo único (SNP, *single nucleotide polymorphims*) em quatro genes (*VDR, CYP24A1, CYP2R1* e *DBP*) modificaram a resposta

à suplementação, avaliada pela concentração plasmática de 25(OH)D.[62]

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos últimos anos, os estudos avançaram muito no sentido de compreender melhor a patologia da Aids. A velocidade de progressão da doença e variações genéticas individuais podem ocasionar resistência à infecção por HIV. Esses resultados possibilitam o desenvolvimento de terapias gênicas específicas, melhorando o prognóstico dos indivíduoas infectados. Apesar de estado nutricional e consumo de nutrientes específicos serem relacionados com a progressão da Aids e com desfechos como mortalidade, ainda são poucos os estudos que relacionam variações genéticas que influenciam o estado nutricional ou a modulação da expressão gênica por nutrientes e compostos bioativos de alimentos em pacientes HIV+. É importante que se realizem mais estudos para avaliar se seriam necessárias intervenções nutricionais com doses elevadas de vitamina D3 ou de ferro para indivíduos com genótipos específicos, ou ainda se pacientes HIV+ se beneficiariam ou não com a suplementação de vitamina A. Essas questões podem ser elucidadas a partir da determinação dos mecanismos de ação desses nutrientes especificamente nessa população, controlando-se fatores de confusão como a carga viral e o genótipo para o CCR5.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sodora DL, Silvestri G. Immune activation and Aids pathogenesis. Aids. 2008 Feb 19;22(4):439-46.
2. Mellors JW, Margolick JB, Phair JP, Rinaldo CR, Detels R, Jacobson LP et al. Prognostic value of HIV-1 RNA, CD4 cell count, and CD4 cell count slope for progression to Aids and death in untreated HIV-1 infection. Jama. 2007;297(21):2349-50.
3. Hunt PW, Deeks SG, Bangsberg DR, Moss A, Sinclair E, Liegler T et al. The independent effect of drug resistance on T cell activation in HIV infection. Aids. 2006;20(5):691-99.
4. Holm GH, Gabuzda D. Distinct mechanisms of CD4+ and CD8+ T-cell activation and bystander apoptosis induced by human immunodeficiency virus type 1 virions. J Virol. 2005;79(10):6299-311.
5. Hunt PW, Martin JN, Sinclair E, Bredt B, Hagos E, Lampiris H et al. T cell activation is associated with lower CD4+ T cell gains in human immunodeficiency virus-infected patients with sustained viral suppression during antiretroviral therapy. J Infect Dis. 2003;187(10):1534-43. Epub 2003 Apr 23.
6. Hunt PW, Brenchley J, Sinclair E, McCune JM, Roland M, Page-Shafer K et al. Relationship between T cell activation and CD4+ T cell count in HIV-seropositive individuals with undetectable plasma HIV RNA levels in the absence of therapy. J Infect Dis. 2008;197(1):126-33.
7. Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ et al. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrintestinal tract. J Exp Med. 2004;200(6):749-59.
8. Moore JP, Kitchen SG, Pugach P, Zack JA. The CCR5 and CXCR4 co-receptors: central to understanding the transmission and pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 infection. Aids Res Hum Retroviruses. 2004;20(1):111-26. Review.
9. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. Nat Med. 2006;12(12):1365-71.
10. Owen RE, Heitman JW, Hirschkorn DF, Lanteri MC, Biswas HH, Martin JN et al. NIAID Center for HIV/Aids Vaccine Immunology. HIV+ elite controllers have low HIV-specific T-cell activation yet maintain strong, polyfunctional T-cell responses. Aids. 2010;24(8):1095-105.
11. Triant VA, Lee H, Hadigan C, Grinspoon SK. Increased acute myocardial infarction rates and cardiovascular risk factors among patients with human immunodeficiency virus disease. J Clin Endocrinol Metab. 2007;92(7):2506-12.
12. Grinspoon SK, Grunfeld C, Kotler DP, Currier JS, Lundgren JD, Dubé MP et al. Initiative to decrease cardiovascular risk and increase quality of care for patients living with HIV/Aids: executive summary. Circulation. 2008;118(2):198-210. Epub 2008 Jun 19. No abstract available. Erratum in: Circulation. 2008;118(6):e109.
13. Triant VA, Brown TT, Lee H, Grinspoon SK. Fracture prevalence among human immunodeficiency virus (HIV)-infected versus non-HIV-infected patients in a large U.S. healthcare system. J Clin Endocrinol Metab. 2008;93(9):3499-504.
14. Arnsten JH, Freeman R, Howard AA, Floris-Moore M, Lo Y, Klein RS. Decreased bone mineral density and increased fracture risk in aging men with or at risk for HIV infection. Aids. 2007;21(5):617-23.
15. Desquilbet L, Jacobson LP, Fried LP, Phair JP, Jamieson BD, Holloway M et al. Multicenter Aids Cohort Study. HIV-1 infection is associated with an earlier occurrence of a phenotype related to frailty. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2007;62(11):1279-86.
16. McCutchan JA, Wu JW, Robertson K, Koletar SL, Ellis RJ, Cohn S et al. HIV suppression by Haart preserves cognitive function in advanced, immune-reconstituted Aids patients. Aids. 2007;21(9):1109-17.
17. Odden MC, Scherzer R, Bacchetti P, Szczech LA, Sidney S, Grunfeld C et al. Cystatin C level as a marker of kidney function in human immunodeficiency virus infection: the Fram study. Arch Intern Med. 2007;167(20):2213-19.
18. Hsue PY, Giri K, Erickson S, MacGregor JS, Younes N, Shergill A et al. Clinical features of acute coronary syndromes in patients with human immunodeficiency virus infection. Circulation. 2004;109(3):316-9. Epub 2004 Jan 12.
19. Mary-Krause M, Cotte L, Simon A, Partisani M, Costagliola D. Clinical Epidemiology Group from the French Hospital Database. Increased risk of myocardial infarction with duration of protease inhibitor therapy in HIV-infected men. Aids. 2003;17(17):2479-86.
20. Klein D, Hurley LB, Quesenberry CP Jr, Sidney S. Do protease inhibitors increase the risk for coronary heart disease in patients with HIV-1 infection? J Acquir Immune Defic Syndr. 2002;30(5):471-77.
21. Paton N. The Insight Smart Study Group Association between activation of inflammatory and coagulation pathways and mortality during long-term follow up in Smart MRC Clinical Trials Unit, London, United Kingdom IAS 2009. Abstract MOPEA034.
22. Neuhaus J, Jacobs DR Jr, Baker JV, Calmy A, Duprez D, La Rosa A et al. Markers of inflammation, coagulation, and renal function are elevated in adults with HIV infection. J Infect Dis. 2010;201(12):1788-95.

23. Ioannidis JP, Contopoulos-Ioannidis DG, Rosenberg PS, Goedert JJ, De Rossi A, Espanol T et al. HIV Host Genetics International Meta-Analysis Group. Effects of CCR5-delta32 and CCR2-64I alleles on disease progression of perinatally HIV-1-infected children: an international meta-analysis. Aids. 2003;17(11):1631-38.
24. Ioannidis JP, Rosenberg PS, Goedert JJ, Ashton LJ, Benfield TL, Buchbinder SP et al. International meta-analysis of HIV host genetics. Effects of CCR5-Delta32, CCR2-64I, and SDF-1 3' A alleles on HIV-1 disease progression: An international meta-analysis of individual-patient data. Ann Intern Med. 2001;135(9):782-95.
25. Hendel H et al. New class I and II HLA alleles strongly associated with opposite patterns of progression to Aids. J Immunol. 1999;162(11):6942-46.
26. Winkler C et al. Genetic restriction of Aids pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. Alive Study, Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter Aids Cohort Study (Macs), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC). Science. 1998;279(5349):389-93.
27. Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R et al. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to Aids by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter Aids Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, Alive Study. Science. 1996;273(5283):1856-62.
28. Eugen-Olsen J, Iversen AK, Garred P, Koppelhus U, Pedersen C, Benfield TL et al. Heterozygosity for a deletion in the CKR-5 gene leads to prolonged Aids-free survival and slower CD4 T-cell decline in a cohort of HIV-seropositive individuals. Aids. 1997;11(3):305-1.
29. Michael NL, Louie LG, Rohrbaugh AL, Schultz KA, Dayhoff DE, Wang CE et al. The role of CCR5 and CCR2 polymorphisms in HIV-1 transmission and disease progression. Nat Med. 1997;3(10):1160-62.
30. Huang Y, Paxton WA, Wolinsky SM, Neumann AU, Zhang L, He T et al. The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. Nat Med. 1996;2(11):1240-43.
31. Munerato P, Azevedo ML, Sucupira MCA, Acceturi C, Pardini R, Pinto GN et al. Prevalence of polymorphisms of genes coding for the HIV-1 co-receptors CCR5 and CCR2 in a Brazilian population. Brazilian Journal of Infectious Diseases. 2003;7(4):236-40.
32. Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. Cell. 1996;86(3):367-77.
33. Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM et al. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. Nature. 1996;382(6593):722-25.
34. Roda Husman AM, Koot M, Cornelissen M, Keet IP, Brouwer M, Broersen SM et al. Association between CCR5 genotype and the clinical course of HIV-1 infection. Ann Intern Med. 1997;127(10):882-90.
35. Glass WG, Lim JK, Cholera R, Pletnev AG, Gao JL, Murphy PM. Chemokine receptor CCR5 promotes leukocyte trafficking to the brain and survival in West Nile virus infection. J Exp Med. 2005;202(8):1087-98.
36. Yang YF, Mukai T, Gao P, Yamaguchi N, Ono S, Iwaki H et al. A non-peptide CCR5 antagonist inhibits collagen-induced arthritis by modulating T cell migration without affecting anti-collagen T cell responses. Eur J Immunol. 2002;32(8):2124-32
37. Prahalad S. Negative association between the chemokine receptor CCR5-32 polymorphism and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. Genes and Immunity. 2006;7:264-68.
38. Fischereder M, Luckow B, Hocher B, Wüthrich RP, Rothenpieler U, Schneeberger H et al. CC chemokine receptor 5 and renal-transplant survival. Lancet. 2001;357(9270):1758-61.
39. Barcellos LF, Schito AM, Rimmler JB, Vittinghoff E, Shih A, Lincoln R et al. CC-chemokine receptor 5 polymorphism and age of onset in familial multiple sclerosis. Multiple Sclerosis Genetics Group. Immunogenetics. 2000;51(4-5):281-88.
40. Dean M, Jacobson LP, McFarlane G, Margolick JB, Jenkins FJ, Howard OM et al. Reduced risk of Aids lymphoma in individuals heterozygous for the CCR5-delta32 mutation. Cancer Res. 1999;59(15):3561.
41. Wald O, Pappo O, Ari ZB, Azzaria E, Wiess ID, Gafnovitch I et al. The CCR5Delta32 allele is associated with reduced liver inflammation in hepatitis C virus infection. Eur J Immunogenet. 2004;31(6):249-52.
42. Xiang J et al. Effect of coinfection with GB virus C on survival among patients with HIV infection. N Engl J Med. 2001;345(10):707-14.
43. Perkins M, Liebner J, Himelfarb D, Edward H, Brenchley J, Stapleton J et al. Down-regulation of CCR5 by its ligands decreases number of target cells for HIV-1 in GBV-C-infected individuals. CROI 2011, Paper # 26.
44. Stromájer-Rácz T, Gazdag Z, Bélagyi J, Vágvölgyi C, Zhao RY, Pesti M. Oxidative stress induced by HIV-1 F34IVpr in Schizosaccharomyces pombe is one of its multiple functions. Exp Mol Pathol. 2010;88(1):38-44.
45. Deshmane SL, Mukerjee R, Fan S, Del Valle L, Michiels C, Sweet T et al. Activation of the oxidative stress pathway by HIV-1 Vpr leads to induction of hypoxia-inducible factor 1alpha expression. J Biol Chem. 2009;284(17):11364-73.
46. Lichterfeld M, Mou D, Cung TD, Williams KL, Waring MT, Huang J et al. Telomerase activity of HIV-1-specific CD8+ T cells: constitutive up-regulation in controllers and selective increase by blockade of PD ligand 1 in progressors. Blood. 2008;112(9):3679-87.
47. Cahn P, Ruxrungtham K, Gazzard B, Diaz RS, Gori A, Kotler D et al. A nutritional intervention (NR100157) reduced CD4+ T-cell decline and immune activation: a one year multicenter randomised controlled double-blind trial in HIV-infected subjects not receiving antiretroviral therapy (the Bite study). Clin Infect Dis. 2013;57(1):139-46.
48. Accetturi CA, Pardini R, Novaes Pinto GH, Turcato G Jr, Lewi DS, Diaz RS. Effects of CCR5 genetic polymorphism and HIV-1 subtype in antiretroviral response in Brazilian HIV-1 infected patients. J Acquir Immune Defic Syndr. 2000;24(4):399-400.
49. Souza IE, Zhang W, Diaz RS, Chaloner K, Klinzman D, Stapleton JT. Effect of GB virus C on response to antiretroviral therapy in HIV infected Brazilians. HIV Med. 2006;7:2531.
50. Maidana-Giret MT, Silva TM, Sauer MM, Tomiyama H, Levi JE, Bassichetto K et al. GB virus type C infection modulates T-cell activation independently of HIV-1 viral load. Aids. 2009;23(17):2277-87.
51. Yi G, Choi JG, Bharaj P, Abraham S, Dang Y, Kafri T et al. CCR5 gene editing of resting CD4(+) T cells by transient ZFN expression from HIV envelope pseudotyped nonintegrating lentivirus confers HIV-1 resistance in humanized mice. Mol Ther Nucleic Acids. 2014;3:e198.

52. Lalezari J, Mitsuyasu R, Deeks S, Wang S, Lee G, Holmes M et al. Successful and persistent engraftment of ZFN-M-R5-D autologous CD4 T cells (SB-728-T) in aviremic HIV-infected subjects on Haart. Croi 2011, Paper # 46.
53. Raiten DJ. Nutrition and pharmacology: general principles and implications for HIV. Am J Clin Nutr. 2011;94(6):1697S-1702S.
54. Lundgren JD, Mocroft A. Anemia and survival in human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis 2003;37(suppl 4):S297-303.
55. Gordeuk VR, Onojobi G, Schneider MF, Dawkins FW, Delapenha R, Voloshin Y et al. The association of serum ferritin and transferrin receptor concentrations with mortality in women with human immunodeficiency virus infection. Haematologica. 2006;91(6):739-43. Epub 2006 May 16.
56. McDermid JM, van der Loeff MF, Jaye A, Hennig BJ, Bates C, Todd J et al. Mortality in HIV infection is independently predicted by host iron status and SLC11A1 and HP genotypes, with new evidence of a gene-nutrient interaction. Am J Clin Nutr. 2009;90(1):225-33.
57. Tovo PA, Gabiano C, Tulisso S. Maternal clinical factors influencing HIV-1 transmission. Acta Paediatr Suppl. 1997;421:52-55.
58. Mills EJ, Wu P, Seely D, Guyatt GH. Vitamin supplementation for prevention of mother-to-child transmission of HIV and pre-term delivery: a systematic review of randomized trial including more than 2800 women. Aids Res Ther. 2005;2:4.
59. Kongnyuy EJ, Wiysonge CS, Shey MS. A systematic review of randomized controlled trials of prenatal and postnatal vitamin A supplementation of HIV-infected women. Int J Gynaecol Obstet. 2009;104(1):5-8.
60. Mehta S, Fawzi W. Effects of vitamins, including vitamin A, on HIV/Aids patients. Vitam Horm. 2007;75:355-83.
61. Mehta S, Giovannucci E, Mugusi FM, Spiegelman D, Aboud S, Hertzmark E et al. Vitamin D status of HIV-infected women and its association with HIV disease progression, anemia, and mortality. PLoS One. 2010;5(1):e8770.
62. Coussens AK, Naude CE, Goliath R, Chaplin G, Wilkinson RJ, Jablonski NG. High-dose vitamin D3 reduces deficiency caused by low UVB exposure and limits HIV-1 replication in urban Southern Africans. Proc Natl Acad Sci USA. 2015;112(26):8052-57.

Intolerância primária à lactose

27

Ana Paula Nunes Bento
Cristiane Cominetti

INTRODUÇÃO

O principal carboidrato presente no leite de mamíferos é a lactose, dissacarídeo formado pelos monossacarídeos glicose e galactose, unidos por uma ligação beta-glicosídica.[1] A lactose precisa ser hidrolisada no intestino para que a glicose e a galactose possam ser absorvidas pelos enterócitos e utilizadas, respectivamente, como fonte de energia pelo organismo ou como componente de glicolipídeos e glicoproteínas. Essa hidrólise é catalisada pela enzima lactase, que é expressa na membrana apical dos enterócitos, principalmente na porção do jejuno do intestino delgado.[2]

A atividade da lactase é intensa nos primeiros anos de vida, quando o leite é a única ou a principal fonte de nutrientes. No entanto, na maior parte dos mamíferos, a atividade dessa enzima diminui após a fase da lactação. O mesmo ocorre com a maioria dos seres humanos, para os quais essa condição é descrita como não persistência da lactase. Por outro lado, alguns indivíduos mantêm a atividade da lactase ao longo da vida adulta, o que possibilita o consumo de grandes quantidades de leite e derivados, situação denominada como persistência da lactase.[3] Essa persistência da lactase é comum, principalmente, em indivíduos brancos do nordeste da Europa e em nômades do norte da África, populações que, nos seus primórdios, dependiam mais da pecuária do que da agricultura e, por isso, eram grandes consumidoras de laticínios.[4]

O nível e o tempo de curso da perda da atividade da lactase variam consideravelmente entre grupos étnicos: chineses e japoneses perdem entre 80 e 90% da atividade nos primeiros quatro anos após o desmame, enquanto asiáticos e judeus podem reter entre 20 e 30% da atividade, a qual pode demorar vários anos para atingir os níveis mais baixos. Cerca de 10% dos brancos do norte europeu perdem atividade da lactase; entretanto, os menores níveis de atividade podem demorar entre 18 e 20 anos para serem atingidos.[5]

Indivíduos com não persistência da lactase, condição conhecida também como hipolactasia adulta primária, apresentam baixa capacidade de digestão da lactose. Nesses indivíduos, a lactose presente nos laticínios e consumida em excesso não é digerida no intestino delgado, em razão da expressão reduzida de lactase. A lactose não digerida pode ser fermentada por bactérias da porção distal do íleo e do cólon. Os produtos dessa fermentação podem promover sintomas como diarreia, flatulência, dor abdominal, náuseas, vômitos e obstipação (Figura 27.1).[2] A manifestação desses sintomas é denominada intolerância à lactose e foi descrita pela primeira vez por Hipócrates. Apenas na década de 1960 essa condição passou a ser reconhecida e diagnosticada clinicamente.[5]

Estima-se que a prevalência de intolerância à lactose seja de 5% no norte e nordeste da Europa (Grã-Bretanha, Dinamarca e Suécia), de 50% na América do Sul, África e Ásia, podendo chegar a quase 100% em alguns países asiáticos.[6,7] Nos Estados Unidos, a prevalência é de 15% entre os brancos, de 53% entre latino-americanos e de 80% entre os negros.[8] No Brasil, estima-se prevalência de 57% para os brancos e mulatos, de 80% para os negros e de 100% para os japoneses.[9] Em geral, tem-se sugerido que aproximadamente dois terços da população mundial adulta apresente não persistência da lactase.[5]

O diagnóstico laboratorial da intolerância à lactose pode ser feito de diversas maneiras. Na prática clínica, o método mais comum envolve a mensuração da concentração sérica de glicose após a ingestão de 50 g de lactose. Elevação significativa da glicemia após 30 minutos da ingestão de lactose indica alta atividade de lactase.[3,10] Recentemente, a biópsia jejunal tem sido utilizada para determinar a atividade da lactase diretamente. No entanto,

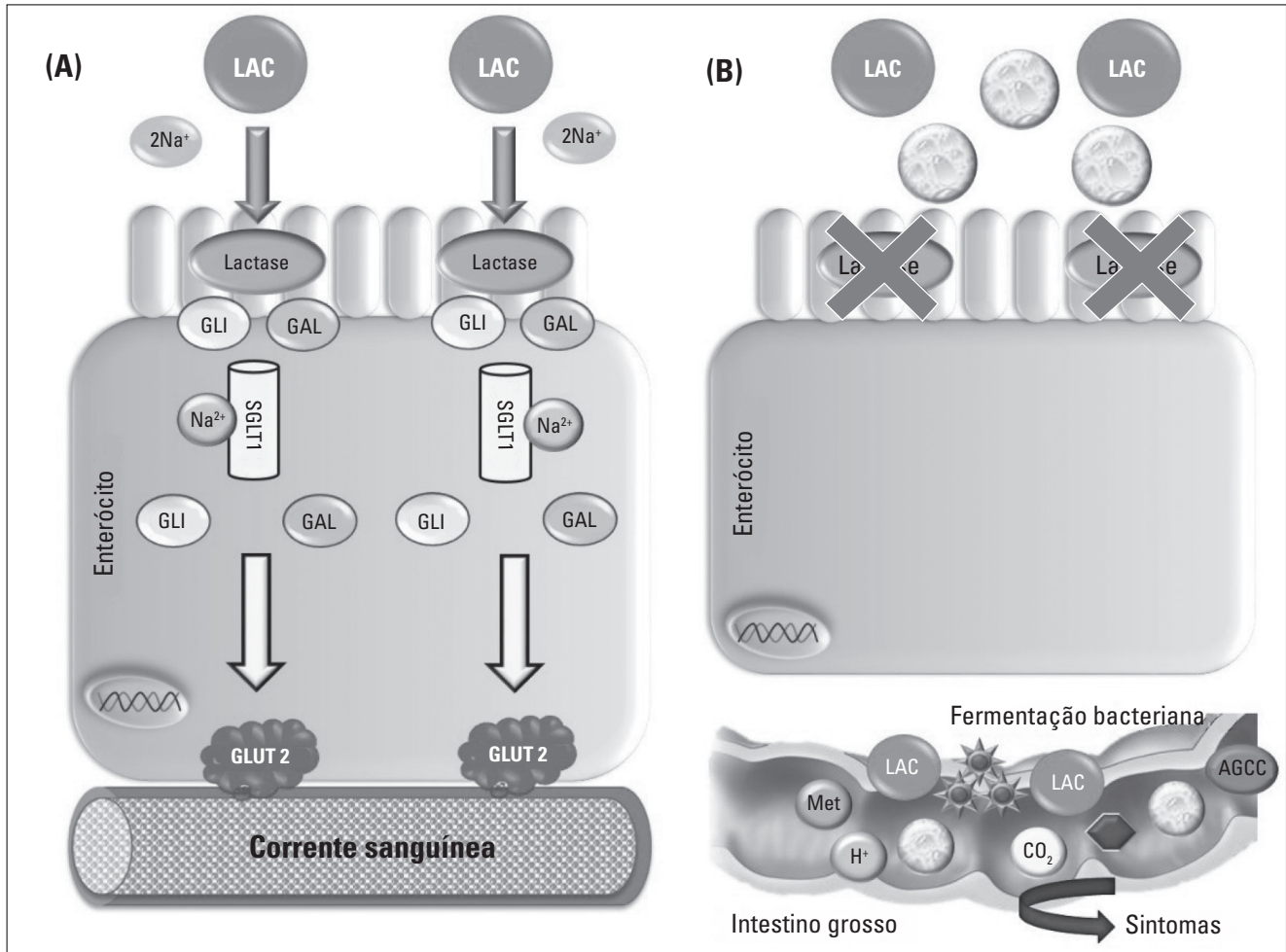



Figura 27.1 (A) A digestão da lactose (LAC) em glicose e galactose é catalisada pela enzima lactase, que é expressa na membrana da borda em escova dos enterócitos. Glicose e galactose adentram a célula intestinal por meio do cotransportador de glicose dependente de sódio 1 (SGLT1) e, por meio da ação do transportador de glicose 2 (GLUT2), são destinadas à corrente sanguínea. (B) A redução ou ausência de expressão da lactase faz com que a digestão da lactose seja prejudicada, e esta se acumula no lúmen do intestino delgado. Parte da lactose que alcança o íleo e o cólon é fermentada por bactérias, o que promove a produção de substâncias como acetaldeído, acetoína, etanol, éster de ácido fórmico e toxinas, as quais estão relacionadas ao aparecimento dos sintomas característicos da intolerância à lactose. $2Na^+$: sódio; AGCC: ácidos graxos de cadeia curta; CO_2: gás carbônico; GAL: galactose; GLI: glicose; H^+: hidrogênio.

outro teste, que avalia o teor de hidrogênio no ar expirado, é considerado o método menos invasivo e de melhor custo-benefício.[11] Nesse teste, um aumento da concentração de hidrogênio superior a 20 ppm, após a administração oral de 50 g de lactose, indica intolerância a esse carboidrato.[5]

Estudos realizados em famílias utilizando testes diagnósticos para intolerância à lactose mostraram que as diferenças fenotípicas interindividuais relacionadas à atividade da lactase devem-se a variabilidade genética.[3] Uma das evidências mais importantes foi verificada em um grande estudo realizado com famílias finlandesas. Sugeriu-se que adultos com baixa atividade da lactase (não persistência da lactase ou hipolactasia primária) seriam homozigotos para um alelo recessivo no gene que codifica a lactase, o que determina a redução de sua atividade após o desmame, enquanto indivíduos com persistência da lactase seriam heterozigotos ou homozigotos para um alelo dominante.[12] A partir desses primeiros resultados, foram realizados diversos estudos com objetivo de esclarecer melhor os mecanismos genéticos envolvidos com a atividade da lactase.

É importante ressaltar que existem outras modalidades de hipolactasia ou deficiência de lactase: a congênita e a secundária. Na deficiência congênita de lactase, o bebê apresenta sintomas desde a primeira exposição ao leite materno e, se não houver restrição completa de lactose desde o nascimento, pode cursar com diarreias intensas e déficit de crescimento. Trata-se de uma doença autossômica recessiva extremamente rara: há apenas cerca de 40 casos relatados na literatura e ainda há poucos esclarecimentos dos mecanismos moleculares envolvidos.[3] Já a

hipolactasia secundária ou adquirida refere-se à perda da atividade da lactase em razão de danos na membrana apical da mucosa intestinal, normalmente causados por enterites infecciosas, giardíase, doença celíaca, doenças intestinais inflamatórias (especialmente a doença de Crohn), entre outras. Esses casos normalmente são transitórios e reversíveis.[13,14]

O objetivo deste capítulo é explorar os mecanismos genéticos da hipolactasia primária, discutindo as associações entre os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP, *single nucleotide polymorphims*), a doença e os aspectos nutricionais.

LACTASE

A lactase (lactase-florizina hidrolase – LPH, *EC 3.2.1.23-62*) é expressa na membrana apical dos enterócitos. Trata-se de uma glicoproteína constituída por dois sítios ativos, um deles responsável pela hidrólise da lactose e o outro envolvido na hidrólise de beta-glicosídeos, incluindo a florizina, os flavonoides glicosídeos, a piridoxina beta-glicosídeo e o beta-galactosídeo.[15]

A lactase é codificada pelo gene *LCT*, de aproximadamente 50 kb e localização cromossômica 2q21.[16] O *LCT* possui 17 éxons e resulta na transcrição de um RNAm de 6.274 nucleotídeos e na tradução de uma proteína composta de 1.927 resíduos de aminoácidos: a lactase. Ela é produzida como um peptídeo precursor de 220 kDa, o qual sofre modificações consideráveis após a transcrição, até atingir a superfície celular sob a forma de uma proteína de 150 kDa.[17]

Em humanos, a partir da oitava semana de gestação já é possível detectar a atividade da lactase na mucosa intestinal. Essa atividade aumenta consideravelmente a partir da 34ª semana, atingindo os maiores níveis próximo ao nascimento. A redução da atividade dessa enzima após o desmame em animais e em seres humanos com não persistência é um mecanismo fisiológico de regulação negativa do gene que codifica a enzima.[2,5]

Durante muitos anos acreditou-se que a persistência da atividade da lactase fosse uma característica "selvagem". Após estudos arqueológicos do DNA e a descoberta de que essa característica também é comum entre animais, constatou-se que se trata, na verdade, do resultado de mutação (Quadro 27.1).[18,19]

EXPRESSÃO GÊNICA DA LACTASE

Estudos familiares mostraram que as diferenças interindividuais na atividade da lactase são decorrentes de polimorfismos genéticos. No estudo de Sahi[12] com famílias finlandesas, sugeriu-se a existência de três genótipos: homozigoto dominante persistente, homozigoto recessivo não persistente e heterozigoto.

Quadro 27.1 A tolerância à lactose como resultado da seleção natural

> Análises arqueológicas de DNA sugeriram que a persistência genética da atividade da lactase era rara no nordeste da Europa no período Neolítico, antes do desenvolvimento da pecuária, há cerca de 10 mil anos. A chamada "hipótese cultural-histórica" propõe que a alta prevalência atual de persistência à lactase no nordeste da Europa resulta de um processo recente de seleção natural. Após a domesticação do gado, com o grande consumo e dependência dos laticínios para sobreviver, aqueles indivíduos que possuíam uma mutação que permitia a persistência da atividade da lactase e, por isso, não apresentavam nenhum problema para digerir leite e derivados, teriam sido favorecidos por apresentarem vantagem seletiva. Outra hipótese seria a da "causa reversa", que defende que o consumo de laticínios teria sido adotado por indivíduos com persistência prévia da lactase.[18,19] No entanto, as evidências arqueológicas favorecem a primeira hipótese, já que análise de DNA mitocondrial de esqueletos do período Neolítico mostrou ausência do alelo responsável pela persistência da lactase.[19]

Boll et al.[17] realizaram estudo que avaliou a sequência de nucleotídeos do gene que codifica a lactase, em indivíduos com persistência e não persistência da enzima, e verificaram que não há diferenças entre os grupos. De acordo com esses autores, os resultados possibilitaram concluir que a codificação da enzima é idêntica em indivíduos com alta e baixa atividade de lactase e que, portanto, a diferença entre os dois fenótipos não estaria na síntese da enzima e sim, provavelmente, na sua regulação pós-transcricional.

Por outro lado, Enattah et al.,[21] usando desequilíbrio de ligação e análise de haplótipo em famílias finlandesas, realizaram investigação mais ampla que incluiu não apenas o gene que codifica a lactase, mas também regiões próximas, e identificaram variantes genéticas localizadas nas posições -13910 pb e -22018 pb da região promotora do gene *LCT*, associadas à não persistência da lactase, a qual foi caracterizada por meio de análises bioquímicas. Verificaram também que o SNP *LCT* -13910 C>T está localizado no íntron 13, e o *LCT* -22018 G>A, no íntron 9 do gene adjacente *MCM6* (*mini-chromosome maintenance protein 6*) na região cromossômica 2q21 (Figura 27.2).

Embora o SNP *LCT* -22018 G>A tenha sido detectado e associado à persistência da lactase, tal associação não foi completa. Já o SNP *LCT* -13910 C>T apresentou associação completa, uma vez que a não persistência da lactase tem correlação com a homozigose para o alelo C, enquanto a persistência associa-se à presença do alelo T. Esses resultados confirmam aqueles encontrados no estudo de Sahi:[12] como o genótipo CC determinou sintomas de intolerância à lactose, e os genótipos CT e TT relacionaram-se à tolerância, foi confirmado o traço re-

cessivo da intolerância à lactose primária, e a heterozigose (genótipo CT) predispõe à presença de níveis intermediários de expressão da lactase. É importante destacar que indivíduos carreadores do genótipo heterozigoto são mais suscetíveis à intolerância à lactose em momentos de estresse ou infecção intestinal.[5]

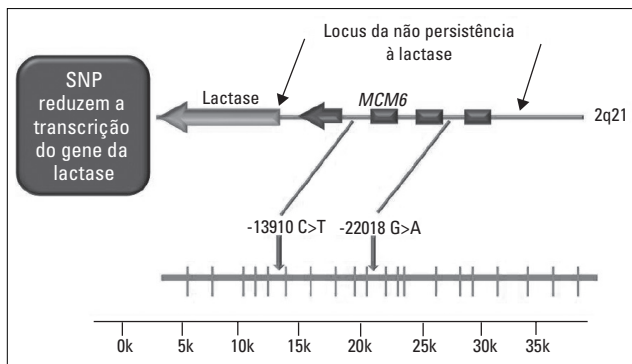



Figura 27.2 Ilustração do gene da lactase, indicando os dois principais polimorfismos de nucleotídeo único envolvidos na não persistência da lactase. MCM6: gene *mini-chromosome maintenance protein 6*; SNP: polimorfismo de nucleotídeo único. **Fonte:** adaptada de Enattah et al.[21]

Os mecanismos que explicam a ação do SNP *LCT* -13910 C>T ainda não são completamente conhecidos. Olds e Sibley[22] demonstraram, por meio de estudo *in vitro*, que a região do DNA onde se encontra o SNP *LCT* -13910 C>T funciona como um elemento *cis*, que é capaz de aumentar a atividade de transcrição na região promotora do gene *LCT*, principalmente na presença do alelo T. Esses resultados sugerem que a ação dos polimorfismos seja realmente em nível de regulação de transcrição do gene *LCT*.[23] Enquanto o alelo T estaria relacionado ao aumento da expressão do RNAm, com consequente persistência da atividade da lactase, o alelo C atuaria reduzindo essa expressão, com consequente redução da atividade da enzima.[24]

Após a descoberta do SNP *LCT* -13910 C>T, foram desenvolvidos testes genéticos de caráter diagnóstico com base nesse polimorfismo. Estudos de coorte realizados com italianos, alemães, brasileiros e outras populações utilizando esses testes demonstraram forte associação entre o SNP *LCT* -13910 C>T e a intolerância e a tolerância à lactose nessas populações.[9, 25-28]

Em contrapartida, dados publicados recentemente indicaram que a presença do SNP *LCT* -13910 C>T não é suficiente para explicar a persistência da lactase na população da África Subsaariana. Esses resultados sugeriram a possibilidade de existir mutações adicionais relacionadas a essa condição. Foram analisadas sequências da região que flanqueia o SNP *LCT* -13910 C>T nessas populações, tendo sido identificadas novas mutações associadas à persistência da lactase: -13915 T>G, -13913 T>C, -13907 C>G e -14010 G>C. O alelo -14010C esteve fortemente associado à persistência da lactase em indivíduos da Tanzânia e do Quênia.[29,30] Já o alelo -13915 G foi encontrado na população bedoína da Arábia Saudita e na Jordânia.[31] Esses dados sugerem múltiplas causas para a persistência da lactase e a necessidade de continuar pesquisando possíveis variantes adicionais que possam explicar a persistência da lactase nas diferentes populações. Conforme mencionado, estudos realizados no Brasil sugerem que o SNP *LCT* -13910C>T explique os casos de persistência da lactase. Em levantamento realizado por Mattar et al.,[9] 43% dos brancos e mulatos brasileiros e 20% dos negros apresentam o alelo T.

TRATAMENTO DA INTOLERÂNCIA À LACTOSE E CONSEQUÊNCIAS NUTRICIONAIS

O tratamento da intolerância à lactose consiste em duas possibilidades clínicas não mutualmente excludentes: a restrição alimentar e a terapia medicamentosa. A recomendação de exclusão de laticínios da alimentação deve ser feita apenas aos indivíduos que apresentam sintomas de intolerância. É importante ressaltar que nem todos os indivíduos com predisposição genética à não persistência da lactase são intolerantes, uma vez que uma quantidade de lactase 50% menor que a usual ainda é suficiente para digerir eficientemente a lactose.[3]

A restrição definitiva de leite e derivados da alimentação não é recomendada por provocar a redução da ingestão de nutrientes importantes como o cálcio, o fósforo e algumas vitaminas, podendo relacionar-se à redução da densidade mineral óssea, à osteoporose e à incidência de fraturas.[32] Alguns estudos chegaram a classificar o genótipo *LCT* -13910 C como um fator de risco para a osteoporose, pois os indivíduos não persistentes e com sintomas de intolerância à lactose são justamente aqueles que precisam restringir o consumo de laticínios para obter redução dos sintomas gastrintestinais.[33, 34]

A reintrodução gradual de laticínios deve ser estimulada como forma de avaliar a tolerância à ingestão de lactose. Nos casos em que haja persistência dos sintomas, medidas farmacológicas podem ser adotadas, como a reposição enzimática com lactase exógena, obtida de leveduras e fungos. A adequação da ingestão diária de cálcio e de vitamina D deve ser avaliada entre os indivíduos intolerantes à lactose. Nos casos em que o consumo estiver insuficiente, a suplementação deve ser indicada.[35]

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A redução na atividade da enzima lactase após o desmame, comum na maioria dos mamíferos e denominada não persistência da lactase, é um fenótipo presente em cerca de 65% da população mundial. O desenvolvimento da biologia molecular possibilitou a descoberta de mecanismos genéticos envolvidos na determinação desse fenótipo. Atualmente, sabe-se que a persistência da atividade da lactase na maioria das etnias é determinada, principalmente, por um SNP localizado na região promotora do gene que codifica a lactase, o *LCT*. Estudos recentes têm demonstrado que pode haver variações na prevalência desse SNP de acordo com a população avaliada. Nesse sentido, é importante que o tema seja ainda mais explorado a fim de favorecer o desenvolvimento de testes genéticos capazes de determinar o genótipo dos indivíduos que apresentam intolerância à lactose com valor diagnóstico, uma vez que os testes de nutrigenética existentes até o momento têm apenas caráter preditivo. A identificação dos indivíduos com hipolactasia primária pode nortear a conduta clínica e nutricional daqueles que apresentam a condição de não persistência da lactase e que manifestem sintomas típicos da intolerância à lactose, no sentido de evitar restrições alimentares desnecessárias que podem favorecer a ocorrência de deficiências nutricionais importantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Solomons NW. Fermentation, fermented foods and lactose intolerance. Eur J Clin Nutr. 2002;56(Suppl. 4):S50-55.
2. Lomer MCE, Parkes GC, Sanderson JD. Lactose intolerance in clinical practice - myths and realities. Aliment Pharmacol Ther. 2008;27:93-103.
3. Swallow DM. Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. Annu Rev Genet. 2003;37:197-219.
4. Wang Y, Harvey CB, Pratt WS, Sams VR, Sarner M, Rossi M et al. The lactase persistence/non-persistence polymorphism is controlled by a cis-acting element. Hum Mol Genet. 1995;4:657-62.
5. Matthews SB, Waud JP, Roberts AG, Campbell AK. Systemic lactose intolerance: a new perspective on an old problem. Postgrad Med J. 2005;81:167-73.
6. Sahi T. Genetics and epidemiology of adult-type hypolactasia. Scand J Gastroenterol. 1994;29:S7-20.
7. Scrimshaw NS, Murray EB. Prevalence of lactose maldigestion. Am J Clin Nutr. 1988;48:1086-98.
8. Tomar BS. Lactose intolerance and other disaccharidase deficiency. Indian J Pediatr. 2014;81:876-80.
9. Mattar R, Monteiro MS, Villares CA, Santos AF, Silva JMK, Carrilho FJ. Frequency of LCT -13910C>T single nucleotide polymorphism associated with adult-type hypolactasia/lactase persistence among Brazilians of different ethnic groups. Nutrition Journal. 2009;8:46.
10. Gugatschka M, Dobnig H, Fahrleitner-Pammer A, Pietschmann P, Kudlacek S, Strele A et al. Molecularly-defined lactose malabsorption, milk consumption and anthropometric differences in adult males. QJM. 2005;98:857-63.
11. Shaw AD, Davies GJ. Lactose intolerance: problems in diagnosis and treatment. J Clin Gastroenterol. 1999;28:208-16.
12. Sahi T, Isokoski M, Jussila J, Launiala K, Pyorala K. Recessive inheritance of adult-type lactose malabsorption. Lancet. 1973;2: 823-26.
13. Gudmand-Hoyer E, Skovbjerg H. Disaccharide digestion and maldigestion. Scand J Gastroenterol. 1996;216:111-21.
14. Saavedra JM, Perman JA. Current concepts in lactose malabsorption an intolerance. Annu Rev Nutr. 1989;9:475-502.
15. Nemeth K, Plumb GW, Berrin JG, Juge N, Jacob R, Naim HY et al. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell betaglucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. Eur J Nutr. 2003;42:29-42.
16. Harvey CB, Fox MF, Jeggo PA, Mantei N, Povey S, Swallow DM. Regional localization of the lactase-phlorizin hydrolase gene, LCT, to chromosome 2q21. Ann Hum Genet. 1993;57:179-85.
17. Boll W, Wagner P, Mantei N. Structure of the chromosomal gene and cDNAs coding for lactase-phlorizin hydrolase in humans with adult-type hypolactasia or persistence of lactase. Am J Hum Genet. 1991;48:889-902.
18. Kretchmer N. Lactose and lactase. Sci Am. 1972;227:71-78.
19. Simoons FJ. Primary adult lactose intolerance and the milking habit: a problem in biologic and cultural interrelations: a culture historical hypothesis. Am J Dig Dis. 1970;15:695-710.
20. Burger J, Kirchner M, Bramanti B, Haak W, Thomas MG. Absence of the lactase-persistence-associated allele in early Neolithic Europeans. Proc Natl Acad Sci. 2007;104:3736-41.
21. Enattah NS, Sahi T, Savilahti E, Terwilliger JD, Peltonen L, Jãverlã I. Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. Nat Genet. 2002;30:233-37.
22. Olds LC, Sibley E. Lactase persistence DNA variant enhances lactase promoter activity in vitro: functional role as a cis regulatory element. Hum Mol Genet. 2003;12:2333-40.
23. Kuokkanen M, Enattah, NS, Oksanen A, Savilahti E, Orpana A, Järvelä I. Transcriptional regulation of the lactase-phlorizin hydrolase gene by polymorphisms associated with adult-type hypolactasia. Gut. 2003;52:647-52.
24. Rasinpera H, Saarinen K, Pelkonen A, Jarvela I, Savilahti E, Kolho KL. Molecularly defined adult-type hypolactasia in school-aged children with a previous history of cow's milk allergy. World J Gastroenterol. 2006;12:2264-68.
25. Babu J, Kumar S, Babu P, Prasad JH, Ghoshal UC. Frequency of lactose malabsorption among healthy southern and northern Indian populations by genetic analysis and lactose hydrogen breath and tolerance tests. Am J Clin Nutr. 2010;91:140-46.
26. Nagy D, Bogácsi-Szabó E, Várkonyi A, Csányi B, Czibula A, Bede O, et al. Prevalence of adult-type hypolactasia as diagnosed with genetic and lactose hydrogen breath tests in Hungarians. Eur J Clin Nutr. 2009;63:909-12.
27. Almon R, Engfeldt P, Tysk C, Sjöström M, Nilsson TK. Prevalence and trends in adult-type hypolactasia in different age cohorts in Central Sweden diagnosed by genotyping for the adult-type hypolactasia-linked LCT-13910C>T mutation. Scand J Gastroenterol. 2007;42:165-70.
28. Schirru E, Corona V, Usai-Satta P, Scarpa M, Cucca F, De Virgiliis S et al. Decline of lactase activity and C/T-13910 variant in Sardinian childhood. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2007; 45:503-06.

29. Ingram CJ, Elamin MF, Mulcare CA, Weale ME, Tarekegn A, Raga TO et al. A novel polymorphism associated with lactose tolerance in Africa: multiple causes for lactase persistence? Hum Genet. 2007;120:779-88.
30. Tishkoff SA, Reed FA, Ranciaro A, Voight BF, Babbitt CC, Silverman JS et al. Convergent adaptation of human lactase persistence in Africa and Europe. Nat Genet. 2007;39:31-40.
31. Imtiaz F, Savilahti E, Sarnesto A, Trabzuni D, Al-Kahtani K, Kagevi I et al. The T/G213915 variant upstreamof the lactase gene (LCT) is the founder allele of lactase persistence in an urban Saudi population. J Med Genet. 2007;44:e89.
32. Di Stefano M, Veneto G, Malservisi S, Cecchetti L, Minguzzi L, Strocchi A et al. Lactose malabsorption and intolerance and peak bone mass. Gastroenterology. 2002;122:1793-99.
33. Enattah NS, Sulkava R, Halonen P, et al. Genetic variant of lactase-persistent C/T–13910 is associated with bone fractures in very old age. J Am Geriatr Soc. 2005;53:79-82.
34. Obermayer-Pietsch BM, Bonelli CM, Walter DE, Kuhn RJ, Fahrleitner-Pammer A, Berghold A et al. Genetic predisposition for adult lactose intolerance and relation to diet, bone density, and bone fractures. J Bone Miner Res. 2004;19:42-47.
35. Montalto M, Curigliano V, Santoro L, Vastola M, Cammarota G, Manna R et al. Management and treatment of lactose malabsorption. World J Gastroenterol. 2006;12:187-91.

28 Doença celíaca e outros distúrbios associados ao glúten

Juliana Xavier de Miranda Cerqueira
Fábio Pires Pereira
Jorge Amil Dias
Maria Daniel Vaz de Almeida

INTRODUÇÃO

Estima-se que o consumo de glúten tenha se intensificado após práticas agrícolas iniciadas há cerca de 10 mil anos no sudoeste da Ásia. Entre o primeiro e o segundo século a.C. foram encontradas as primeiras declarações sobre a doença celíaca (DC), escritas pelo físico grego Areateus. Entretanto, a associação da DC com a alimentação foi somente determinada no século XIX.[1] A partir de então, constata-se um esforço importante da comunidade científica na tentativa de elucidar a fisiopatologia da DC e dos distúrbios gastrintestinais associados ao consumo alimentar de glúten. Na década de 1950, Dicke et al. confirmaram a hipótese de que o consumo de glúten presente no trigo, centeio e cevada desencadeava a DC e que a remoção desses cereais da alimentação promovia melhora acentuada dos sintomas clínicos. Em 1954, Paulley retratou pela primeira vez que as manifestações clínicas da DC levavam à destruição do epitélio do intestino delgado.[1] Nos últimos anos, após a conclusão do Projeto Genoma Humano e com a aplicação dos estudos de associação ampla do genoma (GWAS, *genome wide association studies*), identificou-se a importante contribuição do genoma no risco de desenvolvimento da DC.[2-5]

É bem estabelecido que, entre os fatores ambientais, a alimentação, mais precisamente o consumo de alimentos e/ou produtos alimentícios contendo glúten, associada à individualidade genética, representam agentes modificadores essenciais do risco de desenvolvimento da DC.[6,7] Os distúrbios associados ao glúten (DAG) podem ser agrupados em três entidades clínicas:[7]

- Alergia ao trigo.
- Sensibilidade ao glúten (SG) não celíaca.
- Doença celíaca.

A SG não celíaca foi recentemente reconhecida como uma condição clínica frequente na população mundial.[6,8] Em contrapartida, ainda não está claro se a melhora dos sintomas após a retirada do glúten da alimentação se deve ao glúten propriamente dito ou aos carboidratos fermentáveis, abundantes nos cereais que contêm glúten.[9] Ainda, pouco se sabe acerca dos fatores de risco e mecanismos subjacentes à sua fisiopatologia, bem como com relação aos efeitos clínicos sobre o estado de saúde em curto e longo prazos. Entretanto, identificam-se esforços direcionados na tentativa de diferenciar a DC da SG não celíaca, aprimorando, por exemplo, a estratificação e a abordagem terapêutica dos grupos de risco.[10]

Estudos de genômica nutricional representam estratégia promissora, pois permitem refinar e identificar terapêuticas nutricionais mais efetivas, que respeitem os distintos grupos de risco geneticamente suscetíveis ou não ao desenvolvimento de DAG.[11,12] Incluem, por um lado, a nutrigenética, que busca estabelecer um padrão de nutrição personalizada que considere a individualidade bioquímica em resposta aos nutrientes e compostos bioativos dos alimentos (CBA), de acordo com genótipos distintos. Por outro lado, abrangem a nutrigenômica, que auxilia na compreensão de como os nutrientes e CBA afetam a expressão gênica e o curso das doenças.[11] Evidências sugerem que, em doenças geneticamente complexas, como as mediadas pelo sistema imune, nutrientes e CBA podem interagir com o genoma, diferenciando as respostas genotípicas aos antígenos imunogênicos e, consequentemente, modificando o fenótipo em questão.[11,13] No entanto, pouco se sabe acerca desses mecanismos na DC e em outros DAG, como a SG não celíaca.

Nesse contexto, diante das inconsistências acerca da fisiopatologia e do diagnóstico da SG não celíaca, optou-se por apresentar, nas próximas seções deste capítulo, as últimas evidências mais consistentes sobre as possí-

veis interações entre glúten e nutrientes-(epi)genoma e seus efeitos sob a integridade da barreira intestinal em celíacos, bem como sobre a epidemiologia e a fisiopatologia da SG não celíaca. Por fim, serão relatadas as expectativas a respeito da inserção na prática clínica de aspectos nutrigenéticos e/ou nutrigenômicos que possam refinar e complementar as terapêuticas nutricionais atualmente recomendadas na DC.

DOENÇA CELÍACA

Aspectos gerais

A DC pode ser definida como uma enfermidade autoimune com enteropatia, ativada pela ingestão de glúten em indivíduos geneticamente predispostos.[6,7] É considerada um problema de saúde pública negligenciado globalmente.[14,15] Estudos epidemiológicos recentes destacam que a sua prevalência estimada aumentou em quatro vezes nas últimas cinco décadas, atingindo cerca de 1 a 3% da população mundial[15, 16] e aproximadamente 10% dos familiares de pacientes diagnosticados com DC,[17] ressaltando a importância do componente genético envolvido no desenvolvimento dessa doença.

O conceito de *iceberg* celíaco (Figura 28.1) ilustra a epidemiologia da doença, com elevada proporção de casos não diagnosticados que refletem a importante prevalência populacional da forma subclínica e silenciosa da DC.[18, 19] As dificuldades de rastreamento e de diagnóstico podem ser parcialmente explicadas pelo fato de que a fisiopatologia da doença ainda não está totalmente elucidada e, também, pela divergência relevante nas caraterísticas fenotípicas, genotípicas e clínicas entre os grupos populacionais e etários de pacientes celíacos.[20-22] A população que se inclui no contexto do *iceberg* celíaco, frequentemente de adultos, é assintomática, mas com sorologia positiva e histologia intestinal típica de DC. Representa o grupo de maior risco para desenvolver complicações autoimunes e/ou malignas, como linfoma de células T e adenocarcinomas do intestino delgado.[15]

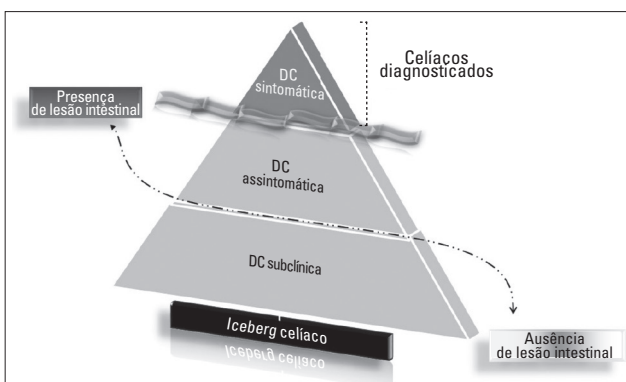



Figura 28.1 *Iceberg* celíaco. DC: doença celíaca. **Fonte:** adaptada de Guandalini.[23]

Os sintomas clínicos da DC são frequentemente normalizados com dieta livre de glúten (DLG). Tais sintomas podem ser divididos em gastrintestinais e extraintestinais.[24-26] Os sintomas gastrintestinais mais frequentes na população pediátrica incluem aqueles associados com má absorção intestinal, como diarreia crônica, distensão abdominal, constipação e perda de peso.[24] Em longo prazo, as complicações gastrintestinais podem promover atraso no crescimento em crianças e baixa estatura nos adolescentes. Por outro lado, os sintomas extraintestinais são mais frequentes na população adulta e normalmente secundários à má absorção, como anemia por deficiência de ferro ou osteoporose resultante da absorção reduzida de vitamina D e cálcio. Outras características clínicas extraintestinais incluem doenças autoimunes como diabetes melito tipo 1, dermatite herpetiforme, neuropatia periférica, pancreatite e tireoidite.[24,27-29]

Após rastreamento sorológico, o diagnóstico da DC é confirmado pela presença de alterações histológicas em biópsias da mucosa do intestino delgado, nomeadamente atrofia vilositária, hiperplasia das criptas e inflamação intestinal profunda.[30] O forte componente genético que associa o sistema imune à fisiopatologia da DC[31] faz com que características funcionais e estruturais do epitélio intestinal celíaco estejam frequentemente alteradas e comprometidas.[25] Mediada principalmente pela atividade de células T, a patogênese da DC é de etiologia complexa e ainda não totalmente esclarecida. Contudo, a exposição de indivíduos geneticamente predispostos ao glúten alimentar compreende o fator fundamental para a iniciação da doença. Recentemente, os estudos GWAS permitiram estimar que o *locus* HLA (*human leukocyte antigen*), que codifica moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC, *major histocompatibilty complex*), explica aproximadamente 40% da variação genética da DC.[4, 32] A Figura 28.2 apresenta um esquema que elucida os critérios de nomenclatura do sistema HLA estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde.[33]

Genes HLA e não HLA

O complexo HLA está localizado na região cromossômica 6p21.3, a qual contém mais de 200 genes e 3 mil alelos conhecidos.[34] Os genes HLA podem ser divididos em três classes; os de classe II codificam os alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 (localizados nos *loci* HLA-DR, -DQ e -DP), os mais relevantes e mais bem caracterizados no contexto da DC. As evidências mais recentes apontam uma resposta imunogênica central dos heterodímeros DQ sobre os perfis genéticos individuais e/ou populacionais, definindo as diferentes manifestações clínicas e o nível de gravidade da DC.[1,34,35] Na Figura 28.3 podem ser visualizados os dife-

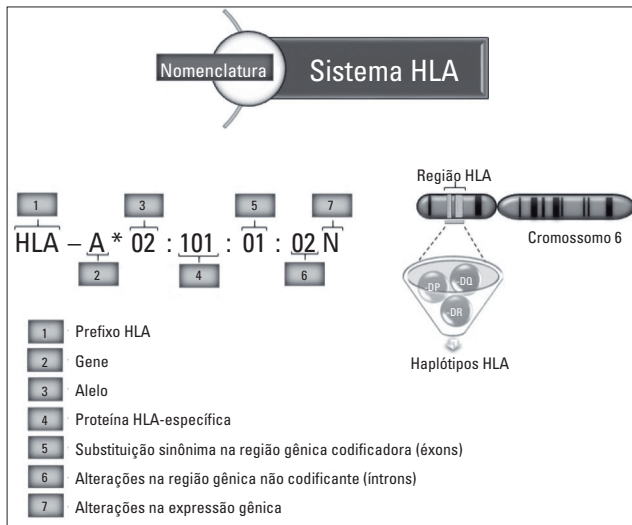



Figura 28.2 Nomenclatura do sistema HLA (*human leukocyte antigen*). **Fonte:** adaptada de Marsh[33] e HLA Nomenclature (disponível em: http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html; acessado em: 11 ago. 2016).

rentes haplótipos HLA associados a maior ou menor risco de desenvolvimento da DC.

Apesar de os alelos HLA-DQ2 e -DQ8 serem frequentes na população celíaca, são também comumente encontrados em indivíduos saudáveis, o que demonstra que, embora sejam necessários para o desenvolvimento da doença em si, não são suficientes.[1,3]

Estudos apontam que não somente celíacos, mas também indivíduos saudáveis são carreadores de alelos HLA-DQ2 ou -DQ8.[3,36] Da mesma forma, enquanto aproximadamente 30% desses indivíduos são carreadores de alelos -DQ2, menos de 5% desenvolverão a doença ao longo da vida.[36] É provável, assim, que outros fatores e/ou mecanismos não HLA estejam envolvidos na fisiopatologia da doença.[37,38] Por esses motivos, o interesse clínico da pesquisa dos alelos HLA associados à doença serve apenas para excluir o risco genético em caso de dúvida de diagnóstico ou em familiares de indivíduos com diagnóstico confirmado. Nesse sentido, os indivíduos negativos para esses haplótipos não necessitam manter vigilância especial ou repetição de testes serológicos.

Fisiopatologia da doença celíaca

A fisiopatologia da DC está ilustrada na Figura 28.4. O fator ambiental que desencadeia a DC é o glúten, constituído coletivamente pelas frações proteicas solúveis em álcool

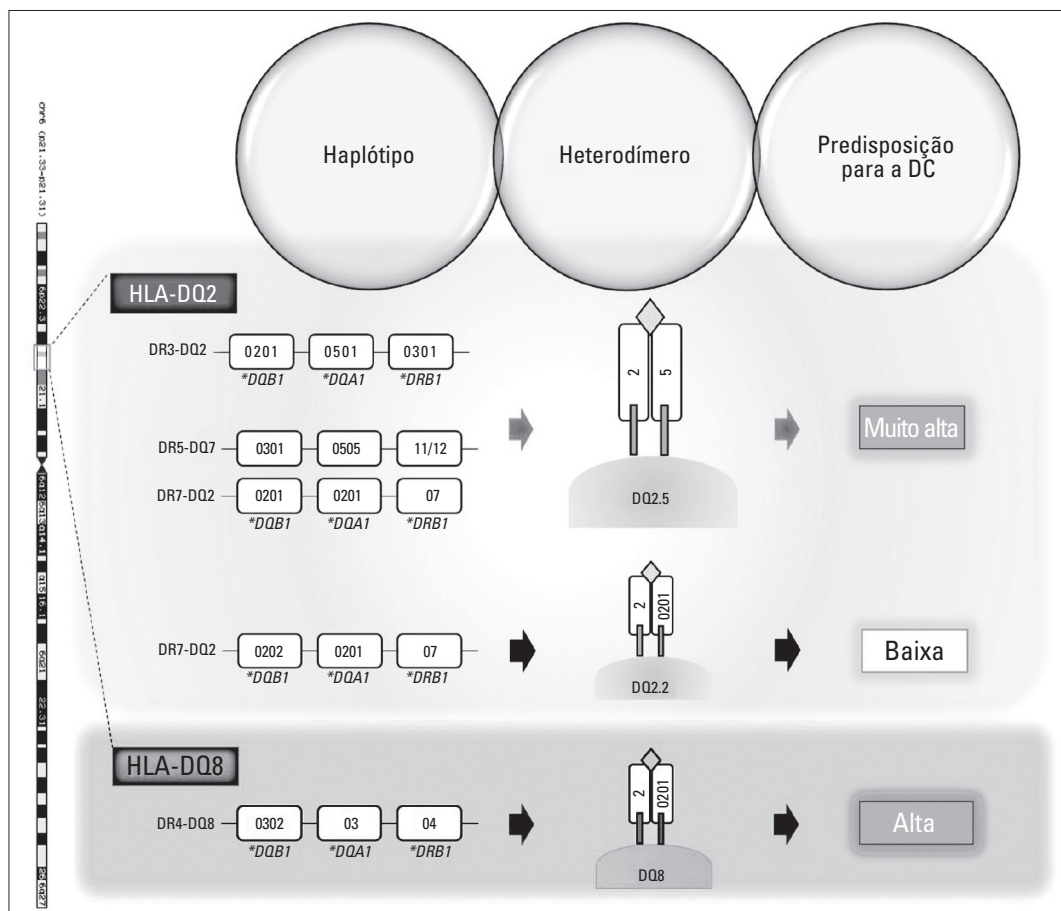



Figura 28.3 Associações dos haplótipos HLA (*human leukocyte antigen*) com a predisposição para a doença celíaca (DC). **Fonte:** adaptado de Abadie et al.[1]

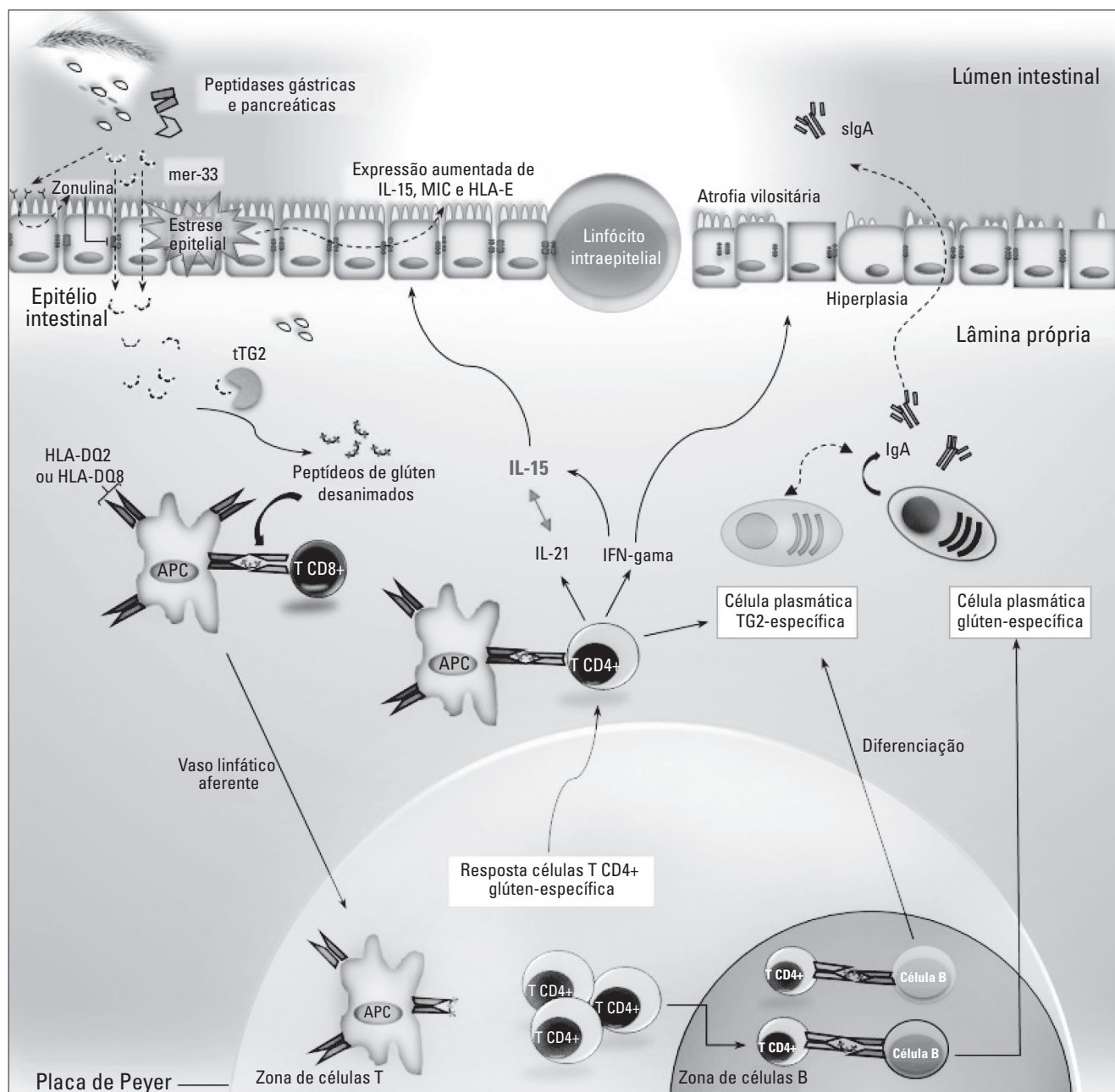



Figura 28.4 Fisiopatologia da doença celíaca. APC: células apresentadoras de antígenos; HLA-DQ2: *human leukocyte antigen DQ2*; HLA-DQ8: *human leukocyte antigen DQ8;* HLA-E: *human leukocyte antigen alfa chain E;* IFN-gama: interferon gama; IgA: imunoglobulina A; IL: interleucina; mer-33: peptídeos resultantes da digestão parcial do glúten; MIC: sequência relacionada ao polipeptídeo MHC classe I; sIgA: imunoglobulina A solúvel; T CD4+: linfócito T auxiliar CD4+; T CD8+: linfócito citotóxico CD8+; TG2: transglutaminase 2; tTG2: transglutaminase tecidual 2. **Fonte:** adaptada de Sollid e Jabri.[25]

provenientes do trigo (gliadina), do centeio (hordeínas) e da cevada (secalina). Estes representam os principais peptídeos de glúten imunogênicos e ativadores da DC, por apresentarem quantidades elevadas de resíduos aminoacídicos de glutamina e prolina. Essas macromoléculas proteicas com peso molecular elevado são parcialmente digeridas pelas enzimas do lúmen intestinal e da membrana apical em peptídeos menores, que são altamente resistentes à degradação por enzimas gastrintestinais presentes no suco gástrico, pancreático e no intestino delgado.[39,40]

Em indivíduos geneticamente predispostos, a exposição da mucosa intestinal ao glúten alimentar desencadeia a ativação desregulada de respostas imunes inatas e/ou adaptativas e inflamatórias.[41] Os enterócitos acoplados ao tecido linfoide associado ao intestino delgado (GALT, *gut-associated lymphoid tissue*) perdem a função de permeabilidade seletiva aos compostos que entram no lúmen intestinal, incluindo a exposição aos antígenos alimentares provenientes do glúten.[42] Isso pode ser desencadeado por dois mecanismos fundamentais. Por

um lado, os peptídeos de gliadina induzem a produção de interleucina-15 (IL-15) pelas células do epitélio intestinal, a qual tem papel central na ativação e na proliferação dos linfócitos T CD8+ intraepiteliais. Posteriormente, esses linfócitos ativados ou citotóxicos participarão do processo de lesão epitelial, já que reconhecem os enterócitos que expressam a molécula de estresse MIC-A e contribuem para sua morte.

Por outro, a expressão do receptor de quimiocinas CXCR3 em nível luminal intestinal representa um importante alvo na fisiopatologia da DC. A união dos peptídeos de gliadina ao receptor CXCR3 das células epiteliais intestinais pode resultar na liberação de zonulina e consequente perda das junções de oclusão (TJ, *tight junctions*), estruturas que sustentam a integridade intestinal. O comprometimento funcional das TJ provoca o desequilíbrio entre tolerância e reconhecimento imunitário dos peptídeos de glúten com consequente aumento da permeabilidade paracelular.[43-45] Isso permite que peptídeos resultantes da digestão parcial do glúten (33-mer) consigam atravessar com maior facilidade o epitélio intestinal. São então desaminados pela enzima transglutaminase tecidual 2 (tTG2), que desempenha papel importante na toxicidade relacionada com o glúten e na produção de anticorpos contra a própria tTG2 e a proteína endomísio.[39]

A enzima tTG2 introduz resíduos acídicos carregados negativamente na estrutura química desses peptídeos, convertendo-os em glutamina e/ou prolina. Dessa forma esses peptídeos imunogênicos são capazes de se ligar aos sulcos carregados positivamente das moléculas HLA-DQ2 e/ou HLA-DQ8, expressas principalmente em células apresentadoras de antígenos (APC) (células B e T ativadas, macrófagos, células dendríticas e epiteliais tímicas).[25,39]

Na lâmina própria, o complexo gliadina (33-mer)--moléculas HLA de classe II é então apresentado pelas APC às células T CD4+, as quais são ativadas e iniciam a resposta imune adaptativa. Espera-se que essa resposta de células T restrita ao complexo de interação entre HLA-DQ2/8 e peptídeos de glúten ocorra somente em pacientes celíacos e não em indivíduos saudáveis.[46]

É bem estabelecido que a via do fator de transcrição designado fator nuclear kappa B (NF-kB) encontra-se constitutivamente alterada na DC. O NF-kB é um regulador essencial da resposta imune adaptativa e controla a ativação, a proliferação e a sobrevivência linfocitária. A ativação do NF-kB favorece o aumento da expressão da ciclo-oxigenase e da óxido nítrico sintase induzível (iNOS), ambas estão envolvidas com a síntese de prostaglandinas e de óxido nítrico (ON).[47]

As principais citocinas e interleucinas pró-inflamatórias produzidas por células T *helper* 1 (Th1) são interferon gama (INF-gama) e IL-15, IL-18 e IL-21, respectivamente.[46] Tem-se ainda que, depois de ativadas, as células T podem estimular a produção de anticorpos pelas células B, principalmente de imunoglobulina A (IgA).[48] Essa resposta humoral é direcionada duplamente contra os epítopos do glúten e contra o antígeno tTG. Grande parte dos pacientes celíacos desenvolve anticorpos IgA contra a enzima tTG,[46] o que compreende um dos principais mecanismos que permite que a comunidade científica classifique a DC como doença autoimune.[43]

Nesse contexto, a combinação das respostas imunes inata e adaptativa conduz à ativação de células T e à produção de citocinas pró-inflamatórias,[38] conferindo intolerância ao glúten alimentar e o consequente perfil intestinal celíaco, caracterizado por atrofia das vilosidades e hiperplasia das criptas no intestino delgado.[39] Em casos mais avançados, nos quais a doença se apresenta em sua forma silenciosa ou quando o indivíduo celíaco não responde à terapêutica de restrição do glúten alimentar, pode também ocorrer infiltração intraepitelial e da lâmina própria por diversas células inflamatórias.[49]

SENSIBILIDADE AO GLÚTEN NÃO CELÍACA

A DC não representa a única condição clínica que responde à retirada do glúten da alimentação.[50] A SG não celíaca foi atualmente reconhecida como um distúrbio gastrintestinal responsivo à presença de glúten alimentar, com estimativas de atingir 6% da população mundial.[6] Atualmente, não há critérios de diagnóstico estabelecidos para a SG não celíaca. Uma questão essencial é esclarecer se os sintomas são induzidos pelas frações peptídicas derivadas do glúten ou por outros constituintes presentes nos alimentos que contêm glúten, como constituintes do trigo ou carboidratos.[6,50]

Os alelos DQ2/DQ8 de maior risco à DC também estão presentes em pacientes com SG não celíaca. Entretanto, DC e SG não celíaca constituem duas condições clínicas causadas por respostas distintas da mucosa intestinal ao glúten alimentar. As lesões típicas na DC são mediadas por vias efetoras do sistema imune inato e adaptativo. De forma distinta, sugere-se que, na SG não celíaca, esteja envolvida apenas a resposta imune inata.[8,51] As evidências indicam que, contrariamente ao que ocorre na DC, a resposta imune inata é ativada, mas sem a presença de enteropatia e de marcadores característicos da DC (p. ex., tTG e EMA elevados, permeabilidade da mucosa intestinal aumentada). É provável que a compreensão completa do envolvimento das vias imunes inata *versus* adaptativa na fisiopatologia da SG não celíaca contribua para a identificação de diferenças clínicas e sorológicas com potencial diagnóstico em pacientes com SG não celíaca e DC.[6,10,50]

Em razão da ausência de critérios de diagnóstico que permitam estimar a prevalência de SG não celíaca, Kabbani et al.[10] desenvolveram um algoritmo diagnóstico para diferenciá-la da DC, por meio da análise de marcadores clínicos, sorológicos e de fatores de risco estabelecidos para DC. Asseguram-se, assim, melhor rastreamento e diagnóstico da enteropatia.[10] Os principais resultados mostraram que indivíduos com SG não celíaca apresentam características clínicas distintas, apesar de resposta comum à restrição do glúten da alimentação:

- Desenvolvem os sintomas em idade precoce em que predomina a constipação em vez dos sintomas de má absorção, deficiências nutricionais ou história pessoal de doença autoimune ou de DC na família.
- Anticorpos IgA-tTG e anticorpos contra o peptídeo gliadina desaminado IgA/IgG não somente apresentam especificidade elevada para a DC na população em geral, mas também em indivíduos que relatam sintomas responsivos à retirada do glúten da alimentação.

Nesse sentido, os conhecimentos e resultados atuais indicam que um indivíduo poderia ser diagnosticado com SG não celíaca quando responde à retirada do glúten da alimentação e quando seus marcadores sorológicos e de histologia duodenal aplicados para o diagnóstico da DC são negativos e não satisfazem ao critério de alergia ao trigo mediada por imunoglobulina E (IgE).[10,50]

GENÔMICA NUTRICIONAL NO CONTEXTO DA DOENÇA CELÍACA

Perspectivas

Como explicado anteriormente neste livro, a genômica nutricional representa uma abordagem promissora que refina as bases das recomendações nutricionais atuais. Isso permite caracterizar subgrupos populacionais e/ou indivíduos de acordo com biomarcadores genéticos que definem o comportamento funcional e fisiológico de um nutriente sobre o metabolismo, bem como em mecanismos epigenéticos capazes de alterar um fenótipo.[52,53]

É evidente que a identificação de variantes genéticas e marcas epigenéticas é de grande utilidade clínica não só para estabelecer marcadores de suscetibilidade às enteropatias ativadas pelo glúten alimentar, mas também para elucidar a fisiopatologia delas. Por permitirem a identificação precoce de indivíduos provavelmente suscetíveis à DC, estratégias genômicas nutricionais personalizadas podem ser potencialmente direcionadas em um período oportuno para a redução do risco do desenvolvimento de sintomas e, possivelmente, da DC por meio de intervenções nutricionais adequadas.[54]

A nutrigenética pode fornecer informações cruciais que explicam como as respostas metabólicas aos nutrientes com funções imunomodulatórias, antioxidantes e anti-inflamatórias podem divergir de acordo com o genótipo de cada indivíduo. No entanto, na população celíaca e, especialmente, na SG não celíaca, excetuando-se os haplótipos DQ, pouco se sabe acerca dos efeitos que variantes polimórficas em regiões codificantes de genes específicos podem promover sob a regulação de diversas vias metabólicas.[12,55]

É prioritário identificar intervenções nutricionais capazes de modular a expressão de genes que codifiquem proteínas envolvidas na neutralização e/ou atenuação da toxicidade de peptídeos do glúten em indivíduos celíacos, o que auxiliará na preservação da integridade da barreira intestinal e, consequentemente, na prevenção de possíveis complicações provenientes de deficiências nutricionais predominantes nos celíacos não tratados. Isso inclui não somente a DC, mas também outras enfermidades gastrintestinais que compartilham das mesmas vias autoimunes da DC, como o diabete melito tipo 1 ou outras alterações promovidas pela exposição ao glúten alimentar.[56-58]

Por outro lado, a nutrigenômica acrescenta novas perspectivas acerca do papel reversível que a alimentação pode promover no fenótipo celíaco. As principais expectativas desse conceito emergente na comunidade científica é que nutrientes sejam capazes de modular eventos epigenéticos, de regular a expressão gênica e a síntese de mediadores que assegurem a integridade da barreira intestinal em celíacos.[2,12,59]

Nesse sentido, apresentam-se aqui as evidências mais concisas que até então introduzem a genômica nutricional na conduta clínica da DC e que, possivelmente, poderão ser exploradas e extrapoladas em um futuro próximo para outras DAG, como a SG não celíaca.

Deficiências nutricionais relacionadas à doença celíaca

A remoção total do glúten da alimentação por aproximadamente um ano é capaz de reverter o perfil imunoinflamatório da mucosa do intestino delgado celíaco, além de melhorar, na maioria dos casos, o padrão de marcadores imunológicos e os sintomas gastrintestinais associados à doença.[29] Contudo, um padrão de alimentação livre de glúten durante toda a vida pode ser de difícil adesão, principalmente por implicar importante modificação de hábitos alimentares, o que, frequentemente, apresenta custos elevados. Sob a perspectiva nutricional, uma

intervenção que restringe o consumo de alimentos ou produtos alimentícios que contenham glúten, em curto ou longo prazo, se não for devidamente aderida pelo paciente e combinada com um efetivo plano de reeducação alimentar, implica, muitas vezes, deficiências nutricionais importantes na população celíaca, as quais podem estar associadas diretamente à DC, ser consequência da DLG ou resultado da combinação dos dois fatores.[60,61]

Em pacientes celíacos recém-diagnosticados, observa-se uma deficiência predominante de macro e micronutrientes essenciais à saúde global, como na modulação das respostas imunes e inflamatórias. Entre os micro e macronutrientes mais afetados quando a DC está ativa, estão ferro, ácido fólico, cálcio, zinco, vitaminas D, B12 e B6 e ácidos graxos essenciais.[29,61,63]

Aspectos nutrigenéticos e nutrigenômicos de alguns desses micronutrientes serão discutidos aqui separadamente, bem como a sua influência em genes HLA e não HLA.

Deficiência de ferro

O ferro é absorvido primariamente na região proximal do intestino delgado, local mais gravemente afetado na DC, o que faz que a deficiência desse micronutriente hidrossolúvel represente a carência nutricional mais comum em pacientes celíacos recém-diagnosticados.[60] A prevalência de anemia ferropriva associada a DC, entretanto, pode divergir significativamente entre os grupos populacionais.[16,64] Esses aspectos podem ser globalmente influenciados por inúmeros fatores, como a sensibilidade aprimorada de diagnóstico da doença e/ou a interferência de diversos fatores ambientais e/ou genéticos.[16] Estudos recentes indicam que o perfil genético individual parece modificar o risco de desenvolvimento de anemia na DC. A anemia ferropriva é frequente em aproximadamente 50% dos pacientes com condição subclínica da doença, sendo resistente à suplementação oral com ferro.[64,65]

A baixa efetividade de suplementação com ferro em celíacos não está totalmente elucidada. Entretanto, a anemia por deficiência desse mineral na população celíaca pode ocorrer mesmo na ausência de sintomas gastrintestinais. Além da má absorção típica decorrente das lesões na mucosa intestinal, a inflamação local e sistêmica contribui de maneira importante para o estabelecimento da anemia ferropriva, além de também estar associada com a desregulação do perfil lipídico, agravando o quadro clínico anêmico em celíacos.[66] Um processo inflamatório intestinal instalado pode promover a desregulação da atividade do hormônio hepático hepicidina, principal regulador do metabolismo sistêmico do ferro corporal.[67] As distintas respostas de pacientes celíacos ao ferro proveniente da alimentação ou de suplementos podem ser parcialmente explicadas pelas variações genéticas que regulam a expressão do gene que codifica a proteína hepicidina, afetando direta ou indiretamente a absorção do ferro alimentar e sua liberação por macrófagos para a corrente sanguínea.[68]

Por outro lado, a prevalência acentuada de moléculas DQ2.5 tem sido associada com o *status* de deficiência de ferro. Observa-se ainda que, em pacientes celíacos de origem caucasiana e idade adulta, as variantes que codificam DQ2.2, DQ4 ou DQ2.5 são mais frequentes, comparadas à variante -DQ8. Tais evidências sugerem que, na prática clínica, os testes genéticos de rastreamento para DC devam ser considerados nos indivíduos com deficiência de ferro, independentemente da presença de anemia.[64] Reconhece-se, ainda, a necessidade de se explorar os distintos perfis genéticos que regulam o metabolismo do ferro na população celíaca. Assim, estratégias mais efetivas poderão ser direcionadas na prevenção e/ou correção da anemia ferropriva.

Deficiências de vitamina B6, B12 e folato

Em celíacos recém-diagnosticados e não submetidos à DLG, as deficiências de ácido fólico e de vitamina B12 podem variar entre os diferentes grupos populacionais, podendo atingir cerca de 42% dos casos. A deficiência de vitamina B6, apesar de menos prevalente (14,5%), não deve ser descartada,[63,69,70] porque a capacidade absortiva intestinal comprometida dessas vitaminas hidrossolúveis faz com que pacientes celíacos não tratados sejam mais suscetíveis às alterações no metabolismo da homocisteína.[71] Existem evidências que indicam a existência de uma distribuição diferente na frequência de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) em genes que codificam para enzimas essenciais do metabolismo do folato e que a melhora esperada das concentrações de homocisteína após restrição do glúten varie de acordo com os genótipos individuais. Um exemplo é a presença do alelo T do SNP C677T (rs1801133) no gene da enzima 5,10-metilenotetra-hidrofolato redutase (MTHFR).[72,73] Contudo, a escassez de estudos robustos e conclusivos reforça a necessidade de se realizarem mais investigações que visem elucidar o papel dessa via e seus metabólitos intermediários na DC. Isso permitirá a identificação de possíveis biomarcadores de suscetibilidade genética às alterações presentes nessa via metabólica, bem como identificar, por exemplo, grupos de risco que possam se beneficiar ou não com a suplementação vitamínica do complexo B.[71]

Deficiência de vitamina D e cálcio

A associação entre a disponibilidade de vitamina D e a prevalência de doenças mediadas pelo sistema imune é bem

estabelecida, incluindo a DC. Células T expressam receptores de vitamina D (VDR), os quais podem ser alvos diretos ou indiretos da sua forma química ativa 1,25(OH)2D3, que, ligada ao VDR, pode exercer múltiplos efeitos imunomodulatórios. Vários fatores etiológicos refletem a prevalência importante e elevada de deficiência de vitamina D em pacientes celíacos recém-diagnosticados, entre eles a reduzida habilidade de absorção decorrente da capacidade intestinal celíaca comprometida e/ou da divergência local de exposição dos grupos populacionais a mais ou menos luz solar e/ou até mesmo associada à redução da biodisponibilidade de cálcio na alimentação.[74-76]

Entre os poucos estudos descritos na literatura que buscam identificar associações entre variantes polimórficas regulatórias do metabolismo da vitamina D em celíacos, foi sugerido que polimorfismos no gene que codifica o VDR compreendem marcadores de suscetibilidade ou de proteção para doenças autoimunes, aumentando ou diminuindo o risco para a DC, respectivamente.[77]

O paciente celíaco pode ser também portador de intolerância à lactose, a qual pode decorrer de predisposição genética ou de lesão vilositária intestinal jejunal, já que a enzima lactase é expressa na membrana apical dos enterócitos. Isso implica que, além da restrição do glúten, a lactose presente no leite e derivados também deve ser reduzida ou eliminada temporária ou definitivamente da alimentação. É descrito na literatura que mais de 50% dos pacientes em tratamento consomem menos de 50% das recomendações de ingestão diária de cálcio.[60] Esses dados podem explicar parcialmente a persistência de complicações extraintestinais na população celíaca, como osteopenia e osteoporose em adultos e déficit de crescimento em crianças e adolescentes. A lactase é a principal enzima envolvida na regulação da absorção de lactose em nível intestinal. Dois polimorfismos C/T(-13910) e G/A(-22018) localizados na região regulatória do gene *LCT* que codifica a lactase estão relacionados à persistência ou não da enzima, e as variantes relacionadas à não persistência parecem ser mais frequentes na população pediátrica celíaca, mas não entre indivíduos saudáveis.[78,79]

Nesse contexto, a restrição de laticínios na alimentação pode representar uma terapêutica nutricional efetiva na população celíaca, desde que o diagnóstico clínico e genético tenha sido estabelecido. Os distintos genótipos associados à gravidade da DC podem influenciar a biodisponibilidade do cálcio e, direta ou indiretamente, a biodisponibilidade de outros micronutrientes essenciais, com particular atenção para a vitamina D. Diante do forte componente genético que regula as vias de metabolismo do cálcio e vitamina D, o aconselhamento nutrigenético deve ser considerado.

NUTRIGENÉTICA E DOENÇA CELÍACA

Genes HLA

Atualmente, acredita-se que o desenvolvimento de tolerância ao glúten se inicie em fase precoce da vida e que o período entre 4 e 6 meses de idade compreenda a melhor janela de oportunidade para se estabelecer estratégias de intervenção nutricional efetivas e redutoras do risco de desenvolvimento da DC.[80,81]

Estudos indicam, entretanto, que o momento de introdução do glúten na alimentação de crianças celíacas carreadoras de genótipos HLA-DQ2/DQ8 parece não influenciar o desenvolvimento de DC na infância.[17,82] Apesar de existirem evidências de que a introdução tardia do glúten esteja associada com o atraso do desenvolvimento da doença[17] e embora se reconheça a importância global da amamentação para o estado de saúde pediátrico,[83] sugeriu-se recentemente que a duração da amamentação e/ou a manutenção do aleitamento materno, quando o glúten é introduzido, podem não influenciar o risco de desenvolvimento de DC aos 3 ou 10 anos de idade.[17, 82] Opostamente, sugeriu-se que o papel protetor desempenhado pela amamentação sob a microbiota intestinal pediátrica celíaca parece depender do genótipo HLA de cada indivíduo.[84,85]

Evidências ressaltam, ainda, que a resposta resultante da autoimunidade e da inflamação da mucosa duodenal celíaca favoreça a ocorrência de disbiose, piorando o prognóstico da DC,[86] ou que a composição imunoprotetora do leite materno contra o risco de DC possa divergir entre mães celíacas ou não celíacas.[84]

Todas essas sugestões científicas devem ser analisadas com cautela. No estudo de Vriezinga et al.,[17] por exemplo, os resultados obtidos podem estar diretamente relacionados com a dose de glúten (100 mg/dia) consumida e, certamente, serão objetos de novas investigações que confirmem a consistência dos resultados. Atualmente, não existe ainda, por exemplo, explicação clara para a "epidemia sueca de doença celíaca" observada nos anos 1980 e a sua subsequente redução após modificação de fatores ambientais.[81,87]

A epidemia sueca de DC revelou aumento significativo do número de crianças celíacas, em sua maioria com idade inferior a 2 anos, por cerca de 10 anos a partir de meados da década de 1980. Os principais sintomas clássicos da DC incluíam má absorção intestinal, diarreia e déficit do crescimento.[81] A incidência atingiu níveis elevados como nunca havia sido relatado anteriormente. Após um período 10 anos de alta incidência, esses níveis retornaram rapidamente aos valores antigos.[87] Muitas hipóteses surgiram para tentar explicar esse fenômeno da

DC na população pediátrica sueca. Excluiu-se o fato de que alterações genéticas representariam os principais agentes modificadores da origem e curso da epidemia, já que esta ocorreu em um curto período. Entretanto, reconheceu-se que fatores ambientais, como alimentação e infecções, estavam envolvidos de forma importante. Suspeitou-se, por exemplo, que, como crianças com menos de 2 anos de idade foram as mais afetadas, mudanças nas práticas de alimentação infantil, como a introdução precoce do glúten na alimentação, ou a exposição a episódios infecciosos repetitivos no início da vida, fossem os principais agentes modificadores do risco de desenvolvimento de DC nessa população.[81,87] A antecipação da introdução do glúten na alimentação de crianças suecas ocorreu, principalmente, em razão de medidas de saúde pública que visavam fornecer quantidades extras de ferro nos farináceos e cereais para prevenir o risco de desenvolvimento de anemia. Por outro lado, a prática do aleitamento materno em período que precedeu o decréscimo da incidência da doença sugeriu, ainda, que este pudesse ter tido um efeito protetor ao risco de DC nessa população.[88] Entretanto, não há ainda evidências que confirmem tal hipótese.[17,82]

As infecções sazonais também podem proporcionar momentos de oportunidade para aumentar a sensibilidade ao glúten em indivíduos geneticamente suscetíveis,[14,89] uma vez que crianças nascidas durante o verão podem apresentar risco aumentado para a DC, pois possivelmente são expostas ao glúten da alimentação durante o inverno, quando as infecções são mais comuns.[90] Entretanto, nenhuma dessas hipóteses foi totalmente elucidada até o momento.[81,87]

Genes não HLA

GWAS e estudos que envolvem mapeamento refinado das mais diversas variantes que promovem alterações funcionais na DC vêm conseguindo explicar a complexa etiopatogênese da DC. A combinação do complexo HLA e de polimorfismos em genes não HLA vem ampliando a sensibilidade de diagnóstico daqueles em fase silenciosa da DC, além de permitir melhor identificação e classificação de indivíduos recém-diagnosticados.[4,91]

Na região cromossômica onde se encontra o complexo HLA há centenas de genes com função imunológica, mas com densidade gênica e variabilidade elevadas, além de muitos genes em desequilíbrio de ligação (LD, *linkage desequilibrium*), o que torna difícil apontar uma variante causal.[4,40] Os grandes progressos tecnológicos em bioinformática e a rápida evolução científica na era pós-genoma permitem avançar significativamente na identificação de novos genes funcionais não HLA. A partir do primeiro GWAS na DC, a sensibilidade da identificação de genes não HLA relevantes como fatores genéticos de suscetibilidade à DC aumentou consideravelmente.[34] Dois GWAS posteriores identificaram 57 *loci* em genes não HLA determinantes para a suscetibilidade e envolvidos na fisiopatologia da DC.[4, 37] Sugeriu-se fortemente que a predição do risco para DC em uma população pediátrica poderia ser melhorada adicionando as 57 variantes genéticas não HLA ao genótipo celíaco clássico HLA. Enquanto o genótipo HLA apresenta uma sensibilidade de apenas 35%, o método HLA+57 SNP parece ser mais efetivo, uma vez que aumentou a sensibilidade de rastreamento e de identificação de pacientes celíacos em 63%. Permitiu, ainda, melhor seleção daqueles que precisam de acompanhamento e repetição frequente de testes imunológicos.[3]

Um mecanismo não HLA bem estabelecido envolve a estimulação do receptor CTLA4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4*), situado na membrana dos linfócitos T. A regulação negativa de células T e o risco de DC estão intimamente relacionados à presença de polimorfismos no gene *CTL4*.[41,92] Existe um número amplo de estudos que consideram múltiplas variantes, tanto na região promotora como na região codificadora (íntrons e éxons) desse gene. Contudo, há interesse especial em variações genéticas localizadas na região promotora do *CTL4*, como o SNP -1147 C/T (rs16840252), já que podem afetar de modo direto a atividade transcricional.[92-95]

Quando as células T CD4+ são ativadas, inicia-se uma cascata de vias pró-inflamatórias: células Th1, por exemplo, induzidas por IL-15, IFN-alfa e, possivelmente, IL-18, são coestimuladas para produção e liberação de citocinas (IFN-gama) e interleucinas pró-inflamatórias, incluindo IL-15 e IL-18.[41] Quando estimulado por moléculas expressas na superfície das APC, o receptor CTLA4 transmite um sinal de regulação negativa ao interior dos linfócitos T, inibindo a sua ativação e truncando a consequente cascata inflamatória. Esse mecanismo é atualmente alvo terapêutico de fármacos na prática clínica, pela função que esse receptor desempenha em doenças com componente autoimune.[43,96]

Embora dentro das vias de sinalização envolvidas na resposta imune a região cromossômica 2q33 seja de considerável interesse como um *locus* candidato de suscetibilidade à DC, poucos estudos sistemáticos abrangem toda a região, incluindo, por exemplo, o gene *ICOS*, o qual codifica uma proteína de superfície que desempenha papel fundamental na regulação de células B e na secreção de citocinas.[92,97] Por exemplo, o alelo T do rs10932029 (ICOS IVS1 173) parece aumentar a expressão do gene *CTL4*, reforçando a suscetibilidade à DC, enquanto o alelo T do rs10932037 (ICOS c.1624) aumenta a expressão de *ICOS*, exercendo propriedades protetoras. Além disso,

inúmeros estudos indicam que os polimorfismos no gene *ICOS* estão em LD com SNP no gene *CTLA4*.[92,97-99]

Existe um número considerável de evidências associando a nutrigenética com a modulação da resposta imunoinflamatória em nível intestinal, incluindo doenças que partilham das mesmas vias autoimunes da DC. Entretanto, ainda não está claro como tais interações entre variantes polimórficas e nutrientes possam modificar as principais vias HLA e/ou não HLA no contexto celíaco. Assim, polimorfismos em genes de citocinas que estão associadas com resposta inflamatória crônica mais acentuada, bem como a ação combinada de várias citocinas pró-inflamatórias, poderão desempenhar papel importante ainda não totalmente compreendido no contexto da intolerância ao glúten.[25] Podem representar, ainda, importantes alvos moleculares para estudos que busquem associar, por exemplo, a interação de genótipos com o risco diferenciado de deficiências nutricionais na população celíaca.

Por último, é importante destacar que os fatores associados à modificação do risco de DC não devem ser extrapolados para indivíduos diagnosticados com SG não celíaca porque, apesar de cada vez mais reconhecida, sua patogênese não foi ainda totalmente esclarecida.[83] Resultados, apesar de relevantes para melhor elucidação de estratégias que favoreçam o tratamento da DC, precisam ainda ser explorados e correlacionados com outros aspectos já bem estabelecidos na DC, como possíveis associações com mecanismos "HLA + não HLA" subjacentes à patogênese e que, possivelmente, melhorem o rastreamento e a identificação dos grupos de risco.[3,83,100]

Contudo, os efeitos funcionais desses polimorfismos em moléculas HLA e não HLA não explicam isoladamente a etiopatogênese de uma doença de caráter complexo como a DC. É provável que a lacuna de conhecimento possa ser mais bem elucidada explorando-se tanto alterações na sequência de DNA (principalmente SNP) como alterações epigenéticas que resultam em alterações na estrutura da cromatina e na expressão gênica, isoladas ou em associação.[101-103]

NUTRIGENÔMICA E EPIGENÉTICA NA DOENÇA CELÍACA

No que se refere ao intestino e aos enterócitos, nutrientes e compostos bioativos provenientes da alimentação são capazes de modular inúmeras funções celulares e de modificar a resposta imune e inflamatória. No contexto da DC, a identificação de alvos nutrigenômicos associados com os peptídeos derivados do glúten e/ou com os nutrientes frequentemente deficientes em pacientes representa ferramenta promissora que pode auxiliar não somente no rastreamento e prevenção de complicações da doença, mas também na proposição de novas estratégias de tratamento.

Como descrito anteriormente, os peptídeos de gliadina são reconhecidos pelos linfócitos T que conduzem o sistema imune a uma resposta pró-inflamatória na mucosa intestinal. Contudo, são capazes de exercer outros efeitos em nível celular, como indução da proliferação dos enterócitos (fundamental para o mecanismo hiperplásico presente em lesões da mucosa intestinal celíaca), alterações na estrutura vilositária (forma, modificações da actina, permeabilidade, tráfego vesicular), sinalização e estresse/apoptose. Em geral, esses efeitos são independentes da resposta mediada por linfócitos T, e o mecanismo correspondente e sua relação com a genômica da DC são ainda incertos. Contudo, alguns trabalhos recentes começam a sugerir novos mecanismos na patogênese mediada por glúten, como a interação com fatores de crescimento celular e citocinas.[27,104]

O papel da epigenética na iniciação e na progressão de doenças com características autoimunes, como a DC, tem sido sustentado principalmente pela condução de investigações em células mononucleares do sangue periférico e em biópsias duodenais.[59,100] Modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que variações do epigenoma – incluindo alterações no padrão de metilação do DNA, modificações pós-traducionais de histonas e alterações em microRNA (miR) – podem levar à ativação de clones de células T autorreativas, bem como regular a expressão de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias.[59,103]

Um trabalho recente indica que existem alterações no padrão de metilação de vários promotores gênicos associados com a regulação do NF-kB na mucosa intestinal de pacientes recém-diagnosticados com DC.[2] As alterações observadas foram, de alguma forma, mantidas entre os pacientes celíacos mesmo após mais de dois anos de tratamento com DLG. As diferenças entre os indivíduos dos grupos controle foram menos pronunciadas, sugerindo que as alterações do padrão de metilação em celíacos possam ser parcialmente reversíveis ou que mais tempo seja necessário para que esse padrão seja normalizado.[2]

É relevante identificar nutrientes que tenham a capacidade de modificar o padrão de metilação e/ou outros mecanismos epigenéticos funcionais em genes essenciais na resposta imune. Por exemplo, em reações mediadas por subpopulações de células Th1, os mecanismos epigenéticos (principalmente o aumento dos níveis de acetilação em histonas) podem alterar a acessibilidade de elementos regulatórios que circundam o *locus* de citocinas, como descrito para o *locus* do IFN-gama.[105-107]

Um potencial mecanismo seria a regulação indireta de expressão gênica e de mecanismos epigenéticos por nutrientes. No âmbito da expressão gênica, o aumento das concentrações de ferritina no enterócito parece induzir a deficiência de ferro em celíacos, e esse efeito parece ser dependente da expressão aumentada de TNF-alfa nos linfócitos intestinais.[108] Outro modelo de mecanismo potencial seria pela regulação indireta de mecanismos epigenéticos por meio da ação de nutrientes, como a vitamina D, na modulação das enzimas modificadoras de histonas na diferenciação e adesão do epitélio intestinal.[109] Essas conexões entre a metilação alterada do DNA com o processo de acetilação e metilação de histonas têm contribuído não somente para compreender como a desregulação epigenética acontece em doenças mediadas pelo sistema imune, mas também para o desenvolvimento de novas terapias que possam reverter defeitos epigenéticos.

A Figura 28.5 ilustra como a genômica nutricional pode ser mais bem compreendida no enterócito. Ilustra, por exemplo, como os nutrientes poderiam interagir na sequência do DNA ou na cromatina, bloqueando a síntese de citocinas pró-inflamatórias via regulação de fatores de transcrição nucleares.

Outro mecanismo epigenético relevante na regulação da expressão gênica refere-se ao perfil de expressão de miR. O miR pode atuar na diferenciação e função do epitélio intestinal, e sua expressão parece estar desregulada em pacientes celíacos. Demonstrou-se, por exemplo, que a expressão de miR pode diferir entre crianças celíacas, independentemente de a doença estar ou não ativa.[100] O mesmo foi observado na população celíaca adulta, em que a associação da expressão de miR específicos com alteração da integridade da mucosa intestinal celíaca sugeriu aumento significativo de moléculas envolvidas na resposta imune.[110] Essas respostas distintas podem ser dependentes do peptídeo de glúten (13 e 33-mer) exposto na mucosa intestinal em celíacos.[58]

As evidências atuais sobre a interação entre os miR e o espectro de doenças autoimunes dão origem a uma abordagem promissora para o seu estudo na DC.[111] Tais evidências sugerem, ainda, que miR merecem ser investigados mais profundamente no contexto da DC e que, possivelmente, possam ser extrapolados como potenciais alvos epigenéticos e biomarcadores para a distinção entre pacientes celíacos com diferentes perfis clínicos. Além disso, poderão contribuir para elucidar outros mecanismos epigenéticos e/ou genéticos que participam do desenvolvimento e do curso da DC.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A prevalência de casos celíacos e de intolerância ao glúten atingiu proporções globais significativas nas últimas décadas. A DC, hoje considerada um preocupante problema de saúde pública, vem sendo intensamente

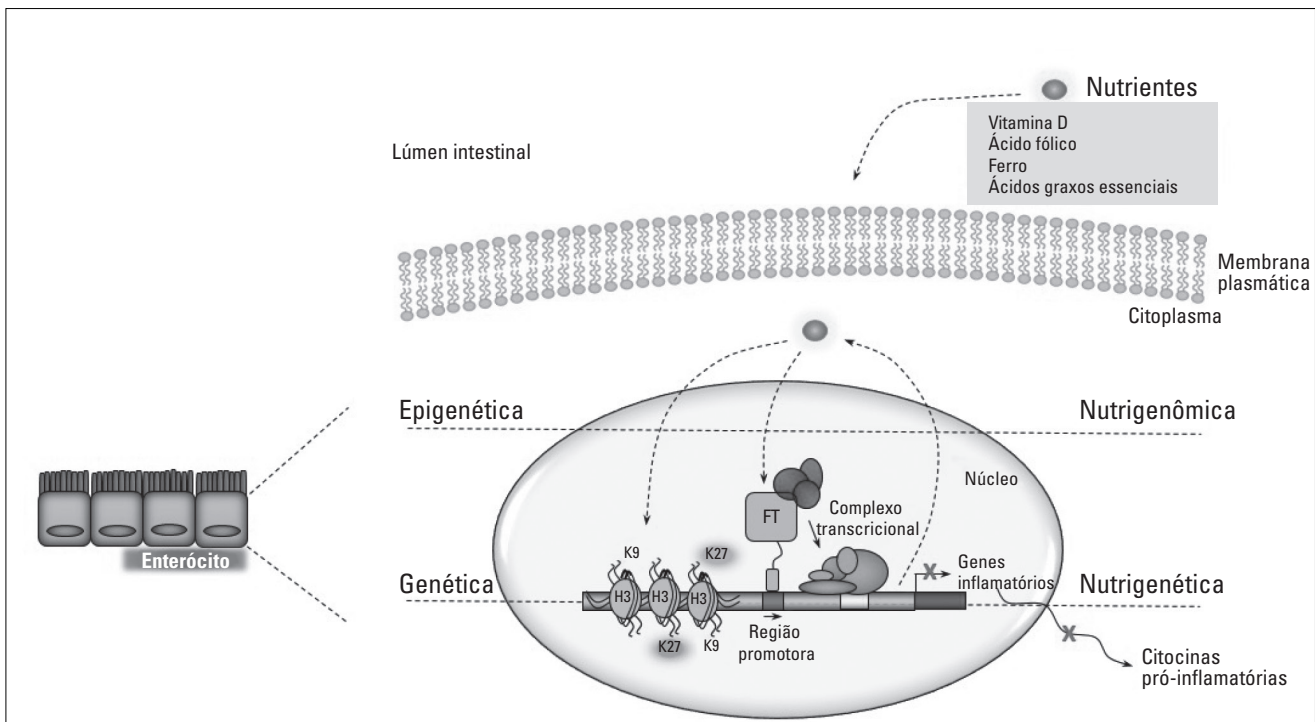



Figura 28.5 Regulação molecular de alvos nutrigenéticos e/ou nutrigenômicos na doença celíaca. FT: fator de transcrição; H3: histona 3; K27: resíduo de lisina 27; K9: resíduo de lisina 9.

investigada pela comunidade científica, em busca da consolidação do rastreamento clínico e de terapêuticas mais efetivas aos distintos perfis genômicos de indivíduos e/ou populações. Identificam-se avanços promissores que vêm permitindo categorizar geneticamente subgrupos populacionais celíacos e a correspondente suscetibilidade ao desenvolvimento de distúrbios gastro e extraintestinais associados ao glúten, incluindo não somente a DC como também a SG não celíaca. Entretanto, as evidências que sustentam a fisiopatologia da DC ainda apresentam uma lacuna importante a ser preenchida. É bem estabelecido que o seu forte componente genético estabelece as distintas respostas que um indivíduo, celíaco ou não, pode apresentar quando exposto ao glúten alimentar.

A DLG compreende a única estratégia efetiva atual para o tratamento da DC. Entretanto, a adoção indiscriminada de uma DLG atingiu proporções consideráveis na população global, incluindo não somente pacientes diagnosticados com DC ou SG não celíaca, mas também indivíduos saudáveis. Algumas evidências sugerem que, em indivíduos não celíacos, a DLG pode promover respostas metabólicas distintas. Isso pode representar um importante problema de saúde pública em longo prazo, pois não há evidências, até o momento, que sustentem a DLG como um hábito alimentar saudável.

A genômica nutricional permite elucidar como a combinação entre a ingestão de nutrientes e o (epi)genoma influenciam a integridade genômica, a expressão gênica, o metabolismo e a função das células. A utilização dos conhecimentos da genômica nutricional na prática clínica pode representar estratégia personalizada protetora contra a toxicidade de peptídeos do glúten, o que possivelmente refinará as atuais recomendações de terapêutica nutricional na DC e em outras DAG. Conforme essas interações entre variações genéticas, epigenética e necessidades nutricionais sejam mais bem compreendidas, as recomendações poderão ser personalizadas para o melhor enfoque terapêutico e/ou para a redução do risco de DC.

Por fim, diante das claras evidências acerca do quebra-cabeça que reside na interação glúten-(epi)genoma e DAG, com particular olhar sobre a DC (Quadros 28.1 e 28.2), aconselha-se que a retirada do glúten da alimentação seja estritamente direcionada aos indivíduos com diagnóstico confirmado de DC ou em casos confirmados de sensibilidade ou alergia ao glúten, mas não para a população sem diagnóstico confirmado. Espera-se que, com o avançar dos estudos científicos, medidas de diagnóstico e de tratamento mais claras e precisas da SG não celíaca sejam também identificadas.

Quadro 28.1 Aspectos importantes em nutrigenética e doença celíaca (DC)

Os genes *HLA-DQ2* e *DQ8* são necessários para o desenvolvimento de DC, mas não são suficientes
Os genes não HLA são determinantes para a suscetibilidade e fisiopatologia de DC
São muitos os genes e vias metabólicas envolvidos e com diferente distribuição entre grupos de DC e saudáveis
Os estudos de nutrigenética são especialmente importantes para determinar os grupos de risco
Mais estudos são necessários para esclarecer o papel dos genes implicados
As investigações nessa área ajudarão a descobrir novas variantes relevantes para a suscetibilidade de desenvolver DC e suas complicações

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abadie V, Sollid LM, Barreiro LB, Jabri B. Integration of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis. Annu Rev Immunol. 2011;29:493-525.
2. Fernandez-Jimenez N, Castellanos-Rubio A, Plaza-Izurieta L, Irastorza I, Elcoroaristizabal X, Amaia Jauregi-Miguel et al. Coregulation and modulation of NFkB-related genes in celiac disease: uncovered aspects of gut mucosal inflammation. Human Molecular Genetics. 2014;23(5):1298-310.
3. Romanos J, Rosén A, Kumar V, Trynka G, Franke L, Szperl A et al. CD risk prediction can be improved by adding non-HLA-susceptible variants to common HLA testing. Gut. 2014;63(3):415-22.
4. Trynka G, Hunt KA, Bockett NA, Romanos J, Mistry V, Szperl A et al. Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease. Nat Genet. 2011;6;43(12):1193-201.
5. Dubois PC, Trynka G, Franke L, Hunt KA, Romanos J, Curtotti A et al. Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. Nat Genet. 2010;42(4):295-302.
6. Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, Biagi F, Fasano A, Green PH et al. The Oslo definitions for celiac disease and related terms. Gut. 2013;62(1):43-52.
7. Mäki M. Coeliac disease: Lack of consensus regarding definitions of coeliac disease. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2012;9(6):305-6.

Quadro 28.2 Nutrigenômica e doença celíaca (DC)

Estudos que elucidem as interações entre nutrientes-(epi)genética na DC são necessários
Espera-se que nutrientes sejam capazes de modificar marcas epigenéticas e modular a produção de mediadores inflamatórios e/ou protetores que assegurem a integridade da barreira intestinal em celíacos
A nutrigenômica acrescenta novas perspectivas acerca do papel reversível que a alimentação poderia promover no fenótipo celíaco
A compreensão da interação entre variação genética, (epi)genoma e necessidades nutricionais na DC poderá refinar o tratamento dietoterápico e/ou a redução do risco de DC

8. Sapone A, Bai JC, Ciacci C, Dolinsek J, Green PH, Hadjivassiliou M et al. Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. BMC Med. 2012;10(2):1-12.
9. Lundin KEA. Non-celiac gluten sensitivity - why worry? BMC Medicine. 2014;12:86.
10. Kabbani T, Vanga RR, Leffler DA, Villafuerte-Galvez J, Pallav K, Hansen J et al. Celiac disease or non celiac gluten sensitivity? An approach to clinical differential diagnosis. Am J Gastroenterol. 2014;109:741-46.
11. Camp KM, Trujillo E. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: nutritional genomics. J Acad Nutr Diet. 2014;114(2):299-312.
12. Ferretti G, Bacchetti T, Masciangelo S, Saturni L. Celiac disease, inflammation and oxidative damage: a nutrigenetic approach. Nutrients. 2012;4(4):243-57.
13. Brookes AJ. The essence of SNPs. Gene. 1999;234:177-86.
14. Ivarsson A, Myléus A, Norström F, van der Pals M, Rosén A, Högberg L et al. Prevalence of childhood celiac disease and changes in infant feeding. Pediatrics. 2013;131:e687-e694.
15. Byass P, Kahn K, Ivarsson A. The global burden of childhood celiac disease: a neglected component of diarrhoeal mortality? PLoS One. 2011;6(7):e22774.
16. Catassi C, Gatti S, Fasano A. The new epidemiology of celiac disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2014;59(Suppl 1):S7-9.
17. Vriezinga SL, Auricchio R, Bravi E, Castillejo G, Chmielewska A, Crespo EP et al. Randomized feeding intervention in infants at high risk for celiac disease. N Engl J Med. 2014;371(14):1304-15.
18. West J, Logan RF, Hill PG, Khaw KT. The iceberg of celiac disease: what is below the waterline? Clin Gastroenterol Hepatol. 2007;5(1):59-62.
19. Last JM. The iceberg: 'Completing the clinical picture' in general practice. Lancet. 1963 ;2:28-31.
20. Fernández-Cavada-Pollo MJ, Alcalá-Peña MI, Vargas-Pérez ML, Vergara-Prieto E, Vallcorba-Gómez-Del Valle I, Melero-Ruiz J et al. Celiac disease and HLA-DQ genotype: diagnosis of different genetic risk profiles related to the age in Badajoz, southwestern Spain. Rev Esp Enferm Dig. 2013;105(8):469-76.
21. Biagi F, Bianchi PI, Vattiato C, Marchese A, Trotta L, Badulli C et al. Influence of HLA-DQ2 and DQ8 on severity in celiac Disease. J Clin Gastroenterol. 2012;46(1):46-50.
22. Clouzeau-Girard H, Rebouissoux L, Taupin JL, Le Bail B, Kalach N, Michaud L et al. HLA-DQ genotyping combined with serological markers for the diagnosis of celiac disease: is intestinal biopsy still mandatory? Pediatr Gastroenterol Nutr. 2011;52(6):729-33.
23. Guandalini S. Exploring the iceberg. Winter. 2009;8(4):1-2.
24. Husby S, Murray JA. Diagnosing coeliac disease and the potential for serological markers. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2014;11(11):655-63.
25. Sollid LM, Jabri B. Triggers and drivers of autoimmunity: lessons from coeliac disease. Nat Rev Immunol. 2013;13(4):294-302.
26. Newton KP, Singer SA. Celiac disease in children and adolescents: special considerations. Semin Immunopathol. 2012;34(4):479-96.
27. Kaukinen K, Mäki M. Coeliac disease in 2013: new insights in dietary-gluten-induced autoimmunity. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2014;11(2):80-82.
28. Ventura A, Ronsoni MF, Shiozawa MB, Dantas-Corrêa EB, Canalli MH, Schiavon LL et al. Prevalence and clinical features of celiac disease in patients with autoimmune thyroiditis: cross-sectional study. Sao Paulo Med J. 2014;132(6):364-71.
29. Lakatos PL, Kiss LS, Miheller P. Nutritional influences in selected gastrointestinal diseases. Dig Dis. 2011;29(2):154-65.
30. Caja S, Mäki M, Kaukinen K, Lindfors K. Antibodies in celiac disease: implications beyond diagnostics. Cell Mol Immunol. 2011;8(2):103-9.
31. Izcue A, Coombes JL, Powrie F. Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. Annu Rev Immunol. 2009;27:313-38.
32. Qiao S-W, Iversen R, Ráki M, Solli LM. The adaptive immune response in celiac disease. Semin Immunopathol. 2012;34:523-40.
33. Marsh SG. WHO nomenclature for factors of the HLA system. Nomenclature Committee for Factors of the HLA System, update September 2009. Tissue Antigens. 2010;75(2):189-96.
34. Dubois PC, van Heel DA. Translational mini-review series on the immunogenetics of gut disease: immunogenetics of coeliac disease. Clin Exp Immunol. 2008;153(2):162-73.
35. Thomas HJ, Ahmad T, Rajaguru C, Barnardo M, Warren BF, Jewell DP. Contribution of histological, serological, and genetic factors to the clinical heterogeneity of adult-onset coeliac disease. Scand J Gastroenterol. 2009;44(9):1076-83.
36. Karell K, Louka AS, Moodie SJ, Ascher H, Clot F, Greco L et al. HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1*05-DQB1*02 (DQ2) heterodimer: results from the European Genetics Cluster on Celiac Disease. Hum Immunol. 2003;64: 469-77.
37. Kumar V, Wijmenga C, Withoff S. From genome-wide association studies to disease mechanisms: celiac disease as a model for autoimmune diseases. Semin Immunopathol. 2012;34(4):567-80.
38. Trynka G, Wijmenga C, van Heel DA. A genetic perspective on coeliac disease. Trends Mol Med. 2010;16(11):537-50.
39. Kupfer SS, Jabri B. Pathophysiology of celiac disease. Gastrointest Endoscopy Clin N Am. 2012;22:639-60.
40. Tjon JM, van Bergen J, Koning F. Celiac disease: how complicated can it get? Immunogenetics. 2010;62(10):641-51.
41. Meresse B, Malamut G, Cerf-Bensussan N. Celiac disease: an immunological jigsaw. Immunity. 2012;36(6):907-19.
42. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. Nat Rev Immunol. 2009;9(11):799-809.
43. Kaukinen K, Lindfors K, Mäki M. Advances in the treatment of coeliac disease: an immunopathogenic perspective. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2014;11(1):36-44.
44. Fasano A. Zonulin, regulation of tight junctions, and autoimmune diseases. Ann N Y Acad Sci. 2012;1258:25-33.
45. Lammers KM, Lu R, Brownley J, Lu B, Gerard C et al. Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor CXCR3. Gastroenterology. 2008;135(1):194-204.
46. Salentijn EM, Mitea DC, Goryunova SV, van der Meer IM, Padioleau I, Gilissen LJ et al. Celiac disease T-cell epitopes from gamma-gliadins: immunoreactivity depends on the genome of origin, transcript frequency, and flanking protein variation. BMC Genomics. 2012;22(13):277.
47. Hayden MS, Ghosh S. NF-kB in immunobiology. Cell Res. 2011;21:223-44.
48. Lebreton C, Ménard S, Abed J, Moura IC, Coppo R, Dugave C et al. Interactions among secretory immunoglobulin A, CD71, and transglutaminase-2 affect permeability of intestinal epithelial cells to gliadin peptides. Gastroenterology. 2012;143(3):698-707.
49. Abadie V, Discepolo V, Jabri B. Intraepithelial lymphocytes in celiac disease immunopathology. Semin Immunopathol. 2012;34: 551-66.
50. Mansueto P, Seidita A, D'Alcamo A, Carroccio A. Non-celiac gluten sensitivity: literature review. J Am Coll Nutr. 2014;33(1):39-54.

51. Sapone A, Lammers KM, Casolaro V, Cammarota M, Giuliano MT, De Rosa M et al. Divergence of gut permeability and mucosal immune gene expression in two gluten-associated conditions: celiac disease and gluten sensitivity. BMC Med. 2011;9(9):23.
52. Fenech M, El-Sohemy A, Cahill L, Ferguson LR, French TC, Tai ES et al. Nutrigenetics and nutrigenomics: viewpoints on the current status and applications in nutrition research and practice. J Nutrigenet Nutrigenomics. 2011;4(2):69-89.
53. Stover PJ, Caudill MA. Genetic and epigenetic contributions to human nutrition and health: managing genome-diet interactions. J Am Diet Assoc. 2008;108(9):1480-87.
54. Ferguson LR. Nutrigenomics and inflammatory bowel diseases. Expert Rev Clin Immunol. 2010;6(4):573-83.
55. Gong G, Méplan C, Gautrey H, Hall J, Hesketh JE. Differential effects of selenium and knock-down of glutathione peroxidases on TNFα and flagellin inflammatory responses in gut epithelial cells. Genes Nutr. 2012;7(2):167-78.
56. Ludvigsson JF, Eylert M, Ilonen J, Ludvigson J, Vaarala O. Effect of HLA DQ2, dietary exposure and coeliac disease on the development of antibody response to gliadin in children. Scand J Gastroenterol. 2006;41(8):919-28.
57. Rubicz R, Yolken R, Alaedini A, Drigalenko E, Charlesworth JC, Carless MA et al. Genome-wide genetic and transcriptomic investigation of variation in antibody response to dietary antigens. Genet Epidemiol. 2014;38(5):439-46.
58. Vaira V, Roncoroni L, Barisani D, Gaudioso G, Bosari S, Bulfamante G et al. MicroRNA profiles in coeliac patients distinguish different clinical phenotypes and are modulated by gliadin peptides in primary duodenal fibroblasts. Clin Sci (Lond). 2014;126(6):417-23.
59. Meda F, Folci M, Baccarelli A, Selmi C. The epigenetics of autoimmunity. Cell Mol Immunol. 2011;8(3):226-36.
60. Theethira TG, Dennis M, Leffler DA. Nutritional consequences of celiac disease and the gluten-free diet. Expert Rev Gastroenterol Hepatol. 2014;8(2):123-29.
61. Shepherd SJ, Gibson PR. Nutritional inadequacies of the gluten-free diet in both recently diagnosed and long-term patients with coeliac disease. J Hum Nutr Diet. 2013;26(4):349-58.
62. Miranda J, Lasa A, Bustamante MA, Churruca I, Simon E. Nutritional differences between a gluten-free diet and a diet containing equivalent products with gluten. Plant Foods Hum Nutr. 2014;69(2):182-87.
63. Wierdsma NJ, van Bokhorst-de van der Schueren MA, Berkenpas M, Mulder CJ, van Bodegraven AA. Vitamin and mineral deficiencies are highly prevalent in newly diagnosed celiac disease patients. Nutrients. 2013;5(10):3975-92.
64. Murray JA, McLachlan S, Adams PC, Eckfeldt JH, Garner CP, Vulpe CD et al. Association between celiac disease and iron deficiency in Caucasians, but not non-Caucasians. Clin Gastroenterol Hepatol. 2013;11(7):808-14.
65. Bottaro G, Cataldo F, Rotolo N, Spina M, Corazza GR. The clinical pattern of subclinical/silent celiac disease: an analysis on 1026 consecutive cases. Am J Gastroenterol. 1999;94:691-96.
66. Abu Daya H, Lebwohl B, Lewis SK, Green PH. Celiac disease patients presenting with anemia have more severe disease than those presenting with diarrhea. Clin Gastroenterol Hepatol. 2013;11(11):1472-77.
67. Evstatiev R, Gasche C. Iron sensing and signaling. Gut. 2012;61: 933e952.
68. Pichler I, Minelli C, Sanna S et al. Identification of a common variant in the TFR2 gene implicated in the physiological regulation of serum iron levels. Human Molecular Genetics. 2011;20(6): 1232-40.
69. Tikkakoski S, Savilahti E, Kolho KL. Undiagnosed coeliac disease and nutritional deficiencies in adults screened in primary health care. Scand J Gastroenterol. 2007;42(1):60-65.
70. Dahele A, Ghosh S. Vitamin B12 deficiency in untreated celiac disease. Am J Gastroenterol. 2001;96(3):745-50.
71. Hozyasz KK, Mostowska A, Szaflarska-Poplawska A, Lianeri M, Jagodzinski PP. Polymorphic variants of genes involved in homocysteine metabolism in celiac disease. Mol Biol Rep. 2012;39(3):3123-30.
72. Hadithi M, Mulder CJ, Stam F, Azizi J, Crusius JB, Pena AS et al. Effect of B vitamin supplementation on plasma homocysteine levels in celiac disease. World J Gastroenterol. 2009;15:955-60.
73. Wilcox GM, Mattia AR. Celiac sprue, hyperhomocysteinemia, and MTHFR gene variants. J Clin Gastroenterol. 2006;40:596-601.
74. Bendik I, Friedel A, Roos FF, Weber P, Eggersdorfer M. Vitamin D: a critical and essential micronutrient for human health. Front Physiol. 2014;11;5:248.
75. Greenhill C. Celiac disease: Lack of vitamins D and K affects bone health in celiac disease. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2011;8(12):660.
76. Mager DR, Qiao J, Turner J. Vitamin D and K status influences bone mineral density and bone accrual in children and adolescents with celiac disease. Eur J Clin Nutr. 2012;66(4):488-95.
77. San-Pedro JI, Bilbao JR, Perez de Nanclares G, Vitoria JC, Martul P, Castaño L. Heterogeneity of vitamin D receptor gene association with celiac disease and type 1 diabetes mellitus. Autoimmunity. 2005;38(6):439-44.
78. Basso MS, Luciano R, Ferretti F, Muraca M, Panetta F, Bracci F et al. Association between celiac disease and primary lactase deficien-cy. Eur J Clin Nutr. 2012;66(12):1364-65.
79. Kruse TA, Bolund L, Grzeschik KH, Ropers HH, Sjöström H, Norén O et al. The human lactase-phlorizin hydrolase gene is located on chromosome 2. Febs Lett. 1988;240(1-2):123-26.
80. Størdal K, White RA, Eggesbø M. Early feeding and risk of celiac disease in a prospective birth cohort. Pediatrics. 2013;132(5): e1202-e1209.
81. Ivarsson A, Persson LA, Nystrom L et al. Epidemic of coeliac disease in Swedish children. Acta Paediatr. 2000;89:165-71.
82. Lionetti E, Castellaneta S, Francavilla R, Pulvirenti A, Tonutti E, Amarri S et al. Introduction of gluten, HLA status, and the risk of celiac disease in children. N Engl J Med. 2014;371(14):1295-303.
83. Ludvigsson JF, Green PH. The missing environmental factor in celiac disease. N Engl J Med. 2014;371(14):1341-43.
84. Olivares M, Neef A, Castillejo G, Palma GD, Varea V, Capilla A et al. The HLA-DQ2 genotype selects for early intestinal microbiota composition in infants at high risk of developing coeliac disease. Gut. 2015;64(3):406-17.
85. Palma GD, Capilla A, Nova E, Castillejo G, Varea V, Pozo T. Influence of milk-feeding type and genetic risk of developing coeliac disease on intestinal microbiota of infants: the Proficel study. PLoS One. 2012;7(2):e30791.
86. Pozo-Rubio T, Olivares M, Nova E, De Palma G, Mujico JR, Ferrer MD et al. Immune development and intestinal microbiota in celiac disease. Clin Dev Immunol. 2012:654143.
87. Ivarsson A. The Swedish epidemic of coeliac disease explored using an epidemiological approach: some lessons to be learnt. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2005;19(3):425-40.
88. Dias JA. A propósito do risco de doença celíaca/On the risk for coeliac disease. Acta Pediatr Port. 2015;46:39-40.

89. Tucci F, Astarita L, Abkari A, Abu-Zekry M, Attard T, Ben Hariz M et al. Celiac disease in the Mediterranean area. BMC Gastroenterol. 2014;11(14):24.
90. Ivarsson A, Hernell O, Nyström L et al. Children born in the summer have increased risk for coeliac disease. J Epidemiol Community Health. 2003;57(1):36-39.
91. Kilpinen H, Barrett JC. How next-generation sequencing is transforming complex disease genetics. Trends in Genetics. 2013; 29(1):23-30.
92. Kaartinen T, Lappalainen J, Haimila K, Autero M, Partanen J. Genetic variation in ICOS regulates mRNA levels of ICOS and splicing isoforms of CTLA4. Mol Immunol. 2007;44(7):1644-51.
93. Song GG, Kim JH, Kim YH, Lee YH. Association between CTLA-4 polymorphisms and susceptibility to celiac disease: a meta-analysis. Hum Immunol. 2013;74(9):1214-18.
94. Gudjónsdóttir AH, Nilsson S, Naluai AT, Ek J, Amundsen SS, Wahlström J et al. Association between genotypes and phenotypes in coeliac disease. Pediatr Gastroenterol Nutr. 2009;49(2):165-69.
95. Zhernakova A, Eerligh P, Barrera P, Wesoly JZ, Huizinga TW, Roep BO et al. CTLA4 is differentially associated with autoimmune diseases in the Dutch population. Hum Genet. 2005;118(1):58-66.
96. Lähdeaho ML, Lindfors K, Airaksinen L, Kaukinen K, Mäki M. Recent advances in the development of new treatments for celiac disease. Expert Opin Biol Ther. 2012;12(12):1589-600.
97. Haimila K, Einarsdottir E, de Kauwe A, Koskinen LL, Pan-Hammarström Q, Kaartinen T et al. The shared CTLA4-ICOS risk locus in celiac disease, IgA deficiency and common variable immunodeficiency. Genes Immun. 2009;10(2):151-61.
98. Brophy K, Ryan AW, Thornton JM, Abuzakouk M, Fitzgerald AP, McLoughlin RM et al. Haplotypes in the CTLA4 region are associated with coeliac disease in the Irish population. Genes Immun. 2006;7(1):19-26.
99. Hunt KA, McGovern DP, Kumar PJ, Ghosh S, Travis SP, Walters JR et al. A common CTLA4 haplotype associated with coeliac disease. Eur J Hum Genet. 2005;13(4):440-44.
100. Capuano M, Laffaldano L, Tinto N, Montanaro D, Capobianco V et al. MicroRNA-449a overexpression, reduced NOTCH1 signals and scarce goblet cells characterize the small intestine of celiac patients. PLoS One. 2011;6(12):e29094.
101. Bergman Y, Cedar H. DNA methylation dynamics in health and disease. Nat Struct Mol Biol. 2013;20(3):274-81.
102. Choi NM, Boss JM. Multiple histone methyl and acetyltransferase complex components bind the HLA-DRA gene. PLoS One. 2012;7(5):e37554.
103. Lim PS, Li J, Holloway AF, Rao S. Epigenetic regulation of inducible gene expression in the immune system. Immunology. 2010;2(6):775-95.
104. Barone MV, Troncone R, Auricchio S. Gliadin peptides as triggers of the proliferative and stress/innate immune response of the celiac small intestinal mucosa. Int J Mol Sci. 2014;15(11):20518-3.
105. Akimova T, Beier UH, Liu Y, Wang L, Hancock WW. Histone/protein deacetylases and T-cell immune responses. Blood. 2012;119(11):2442-51.
106. Fernández-Morera JL, Calvanese V, Rodríguez-Rodero S, Men'endez-Torre E, Fraga MF. Epigenetic regulation of the immune system in health and disease. Tissue Antigens. 2010;76:431-39.
107. Jabri B, Sollid LM. Tissue-mediated control of immunopathology in coeliac disease. Nat Rev Immunol. 2009;9(12):858-70.
108. Sharma N, Begum J, Eksteen B, Elagib A, Brookes M, Cooper BT et al. Differential ferritin expression is associated with iron deficiency in coeliac disease. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2009;21(7):794-804.
109. Pereira F, Barbáchano A, Silva J, Bonilla F, Campbell MJ, Muñoz A et al. Hum Mol Genet. 2011;20(23):4655-65.
110. Magni S, Buoli Comani G, Elli L, Vanessi S, Ballarini E, Nicolini G, Rusconi M, Castoldi M, Meneveri R, Muckenthaler MU, Bardella MT, Barisani D. miRNAs affect the expression of innate and adaptive immunity proteins in celiac disease. Am J Gastroenterol. 2014;109(10):1662-74.
111. Bascuñán-Gamboa KA, Araya-Quezada M, Pérez-Bravo F. MicroRNAs: An epigenetic tool to study celiac disease. Rev Esp Enferm Dig. 2014;106(5):325-33.

29 Sistemas antioxidantes

Ana Paula de Melo Loureiro
Antonio Anax Falcão de Oliveira
Tiago Franco de Oliveira

INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo é apontado como fator importante no envelhecimento e em diversos processos fisiopatológicos, o que permite inferir que moléculas antioxidantes, ao atuarem no combate ao estresse oxidativo, promovem amplos benefícios à saúde. Nesse sentido, demonstrou-se em estudos epidemiológicos observacionais que a ingestão de alimentos ricos em antioxidantes está inversamente relacionada à incidência de câncer e de doenças cardiovasculares.[1-4] Entretanto, passou-se a considerar maior complexidade do papel fisiológico e controle do estresse oxidativo quando a suplementação de antioxidantes, em diversos ensaios clínicos de intervenção, não resultou na proteção esperada contra o desenvolvimento de doenças e mortalidade.[5-7] Em alguns desses ensaios, a suplementação de betacaroteno chegou mesmo a aumentar o risco de eventos cardiovasculares e câncer de pulmão em fumantes e trabalhadores expostos a asbestos.[8,9]

Segundo a definição introduzida em 1985 por Helmut Sies (revisado por Jones, 2006[10]), estresse oxidativo corresponde à perturbação do equilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes, em favor dos primeiros, tendo como resultado a oxidação de biomoléculas (Figura 29.1). Com base nesse conceito, o resultado esperado seria que os estudos clínicos de intervenção com antioxidantes resultassem em evidentes benefícios à saúde. Os resultados contraditórios obtidos, somados ao acúmulo de dados sobre vias de sinalização redox celular, principalmente as vias das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) e do fator nuclear kappa B (NF-kB), revisado por Allen e Tresini,[11] levaram à proposta de refinamento da definição de estresse oxidativo para indicar a "perturbação da sinalização e controle redox celular".[10] Assim, para além da perturbação do equilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes no organismo, resultando em oxidação de biomoléculas, o estresse oxidativo pode ser entendido como um desequilíbrio mais sutil, significando o estado em que a sinalização redox celular é anormalmente alterada, tendo como resultado a modificação anômala da expressão de genes relacionados, por exemplo, a: diferenciação, proliferação, envelhecimento, morte e transformação celular.[10,11] Nesse cenário, encontram-se exemplos de alteração da expressão de genes induzida tanto por espécies reativas de oxigênio (ERO, como H_2O_2 e $O_2^{\bullet-}$) quanto por antioxidantes[11] e pode-se considerar que o desequilíbrio persistente em favor de um ou outro não seja saudável.[12]

Em paralelo à evolução do conceito de estresse oxidativo, tem-se a evolução do conceito de antioxidante. Nesse sentido, antioxidantes são moléculas capazes de limitar a geração e/ou a disponibilidade de ERO, de modo a manter a homeostase da sinalização redox celular e proteger contra a oxidação excessiva de biomoléculas.[12] Infere-se, portanto, a necessidade de as moléculas antioxidantes estarem localizadas nos subcompartimentos celulares geradores de ERO em concentrações adequadas, além de extracelularmente, para sequestrarem as espécies oxidantes radicalares e não radicalares.[13]

Isso é necessário para a geração de produtos menos reativos que as espécies reativas iniciais. É importante notar, no entanto, que nem sempre os produtos gerados são inócuos quando as espécies reativas sequestradas pelos antioxidantes são radicais livres, pois novas espécies radicalares são formadas.[13] Essa visão contribui para o entendimento de que nem sempre moléculas com forte atividade antioxidante *in vitro* apresentam a mesma atividade *in vivo*.[14,15] Tal observação pode explicar parcialmente os dados conflitantes obtidos nos diferentes ensaios clínicos de intervenção com antioxidantes. Com o aumento da

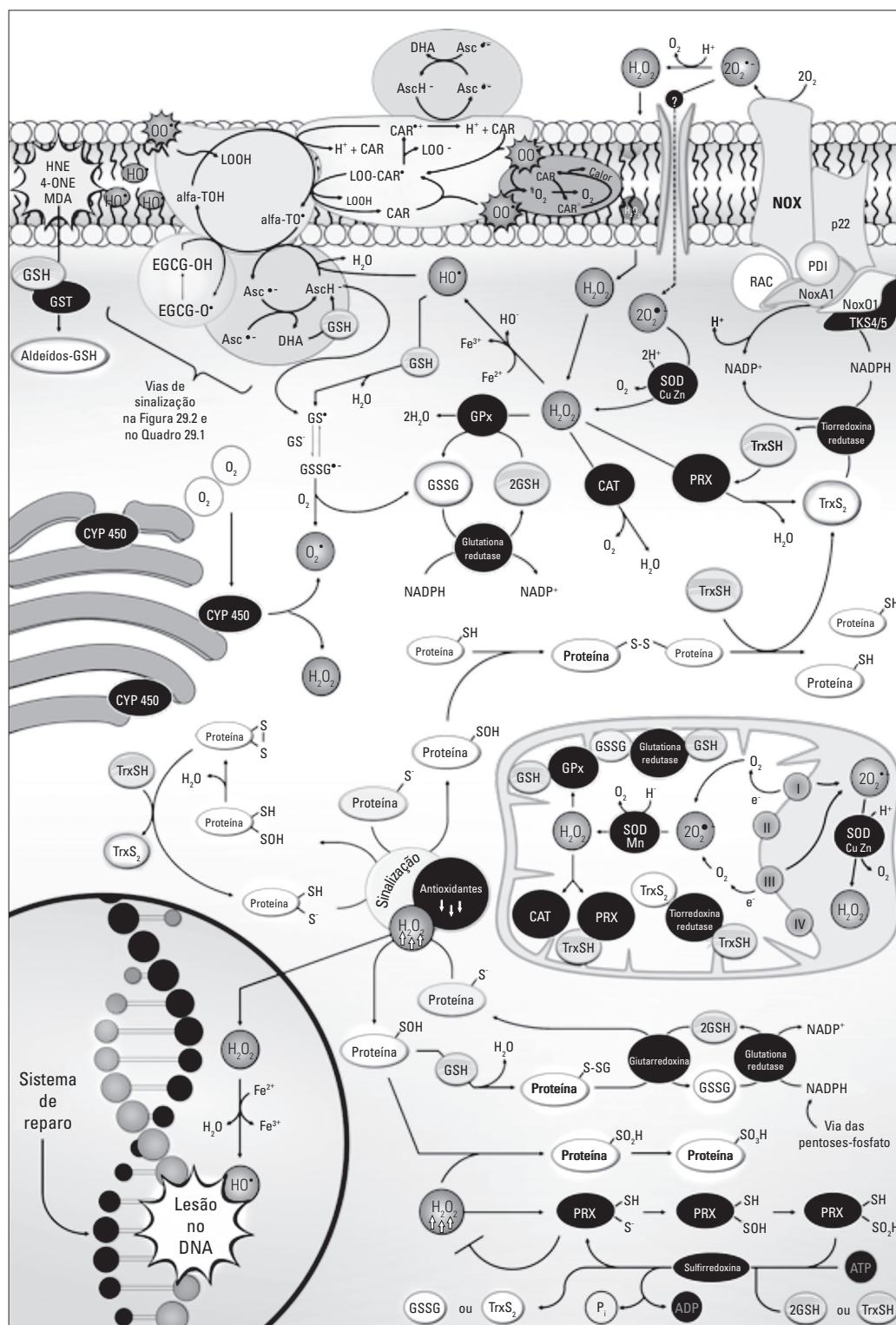



Figura 29.1 Principais reações dos sistemas antioxidantes enzimático e não enzimático (parte superior da figura) e mecanismos básicos envolvidos na sinalização celular redox (parte inferior da figura). ADP: adenosina difosfato; $Asc^{\bullet -}$: radical ascorbil; $AscH^-$: ascorbato; ATP: adenosina trifosfato; CAR: carotenoide; $CAR^{\bullet +}$: cátion radical de carotenoide; CAT: catalase; CYP 450: citocromo P450; DHA: dehidroascorbato; EGCG-O•: radical epigalocatequina galato; EGCG-OH: epigalocatequina galato; GPx: glutationa peroxidase; GS•: radical tiila; Fe^{2+}: ferro; GSH: glutationa reduzida; GSSG: glutationa oxidada; $GSSG^{\bullet -}$: radical dissulfeto; H^+: hidrogênio; H_2O: água; H_2O_2: peróxido de hidrogênio; HNE: 4-hidroxinonenal; HO•: radical hidroxila; LOO•: radical peroxila; LOOH: hidroperóxido lipídico; MDA: malondialdeído; NADP: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato; NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida; $NADP^+$: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada; NOX/p22/PDI/NoxA1/NoxO1/RAC/TKS4/5: complexo enzimático NADPH oxidase; 4-ONE: 4-oxononenal; O_2: oxigênio; $^1O_2$: oxigênio singlete; $O_2^{\bullet -}$: ânion radical superóxido; P_i: fosfato inorgânico; PRX: peroxirredoxina; P-SOH: ácido sulfênico; P-SO_2H: ácido sulfínico; P-SO_3H: ácido sulfônico; SH: grupo tiol; SOD: superóxido dismutase; SOD Cu-Zn: cobre-zinco superóxido dismutase; S-S: ponte dissulfeto; $TrxS_2$: tiorredoxina oxidada; TrxSH: tiorredoxina; alfa-TO•: radical tocoferil; alfa-TOH: alfa-tocoferol.

complexidade do sistema, há ainda aumento da probabilidade de a molécula interagir com diferentes alvos, podendo atuar nas células e tecidos por vias independentes da sua propriedade antioxidante. Considerações a respeito da absorção da molécula, biotransformação com possível alteração da propriedade antioxidante e distribuição tecidual também merecem atenção.[15]

Sabe-se atualmente que os organismos aeróbios geram continuamente ERO e espécies reativas de nitrogênio (ERN, resultantes das reações de $^{\bullet}NO$ com $O_2^{\bullet-}$ e O_2) com diversas reatividades químicas ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2, $^{\bullet}OH$, $^1O_2$, ^-OCl, $ONOO^-$, $NO_2^{\bullet}$, $CO_3^{\bullet-}$, radicais e hidroperóxidos orgânicos) a partir de diferentes fontes celulares.[13, 16] Assim, a evolução paralela de um complexo sistema de defesas antioxidantes, atuando constantemente na remoção de ERO e ERN e na redução de produtos de oxidação, parece ter possibilitado o uso das reações redox para a transmissão de informações no ambiente celular.[17]

ANTIOXIDANTES

O sistema de defesas antioxidantes do organismo conta com uma linha de defesa enzimática e outra não enzimática, atuando de forma balanceada e coordenada. No grupo dos antioxidantes enzimáticos estão as enzimas superóxido dismutase (CuZn-SOD, Mn-SOD), catalase, sistema glutationa/glutationa, peroxidase/glutationa redutase, peroxirredoxinas, tiorredoxina/tiorredoxina redutase, glutarredoxinas e sulfirredoxinas.[18] No grupo dos não enzimáticos, os principais representantes são: glutationa (GSH), ácido ascórbico (vitamina C), tocoferóis/tocotrienóis (vitamina E), polifenóis e carotenoides.[13, 19] Complementando esse sistema de defesas, podem ser citadas também as moléculas que protegem contra a geração de ERO, como as proteínas desacopladoras mitocondriais e as proteínas que minimizam a disponibilidade dos íons dos metais de transição ferro e cobre para participação em reações redox, como transferrina, ferritina, albumina, metalotioneína e ceruloplasmina, entre outras vias protetoras.[18]

A ação cooperativa e coordenada dos sistemas de defesa antioxidante pode ser compreendida ao se conhecer as espécies reativas alvos e os produtos gerados nas reações, os locais em que as diferentes moléculas antioxidantes atuam (compartimentos intracelulares, fluidos extracelulares), seus níveis teciduais e suas diferentes afinidades pelas espécies alvos. Na Figura 29.1 são apresentadas algumas das reações envolvendo as defesas antioxidantes.

Antioxidantes endógenos

O organismo conta com um complexo sistema de antioxidantes gerados endogenamente, dentre os quais serão abordadas aqui as enzimas CuZn-SOD, Mn-SOD, catalase, sistema glutationa/glutationa, peroxidase/glutationa redutase, peroxirredoxinas, tiorredoxina/tiorredoxina redutase, glutarredoxinas, sulfirredoxinas e o tripetídeo GSH (Figura 29.1).

As enzimas superóxido dismutase (SOD) são abundantes no organismo (presentes na ordem de mcM em muitas células ou mg/g de proteína em diversos tecidos) – CuZn-SOD no citosol, lisossomos, núcleo, peroxissomos, fluidos extracelulares e espaço intermembranas mitocondrial, e Mn-SOD na matriz mitocondrial – e catalisam a dismutação do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) a O_2 e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), com constante de velocidade de reação superior a 10^9 $M^{-1}s^{-1}$.[18] Sua atividade favorece a rápida remoção dos radicais $O_2^{\bullet-}$ gerados por diferentes fontes celulares (p. ex., NADPH oxidases, cadeia de transporte de elétrons mitocondrial), prevenindo a reação do $O_2^{\bullet-}$ com biomoléculas, cuja constante de velocidade é muito menor, da ordem de 10 a 10^3 $M^{-1}s^{-1}$.[20, 21]

De forma coordenada, as moléculas de H_2O_2 geradas a partir da dismutação do $O_2^{\bullet-}$ ou outras reações enzimáticas são reduzidas para água pela ação da catalase, das glutationas peroxidases (GPx, contendo selenocisteína) ou das peroxirredoxinas (Prxs).[18, 21] O controle dos níveis de H_2O_2 é importante não só para a adequada sinalização redox celular, mas também para diminuir o risco de sua redução por metais de transição (Fe^{2+}, Cu^+) para o radical hidroxila ($^{\bullet}OH$), o qual é altamente reativo e capaz de oxidar prontamente biomoléculas e iniciar reações de oxidação em cadeia, como a peroxidação lipídica.[17]

A catalase decompõe diretamente H_2O_2 em H_2O e O_2,[18] ao passo que as tiol peroxidases GPx e Prxs reduzem H_2O_2, hidroperóxidos orgânicos (ROOH) e ácido peroxinitroso (ONOOH) para H_2O, alcoóis (ROH) e nitrito (NO_2^-), via oxidação simultânea de GSH e tiorredoxina (Trx).[21] Glutationa e tiorredoxina oxidadas (GSSG e $TrxS_2$) são reduzidas pelas enzimas glutationa redutase e tiorredoxina redutase (enzima contendo selenocisteína), respectivamente, com consumo de NADPH.[22]

A atividade da catalase localiza-se, principalmente, nos peroxissomos, organelas que concentram várias enzimas geradoras de H_2O_2, como as desidrogenases envolvidas na beta-oxidação de ácidos graxos.[18] Quanto às tiol peroxidases GPx e Prxs, diferentes tipos – pelo menos oito isoformas de GPx e seis isoformas de Prxs – encontram-se em fluidos extracelulares, mitocôndrias, peroxissomos e no citosol das células em diversos tecidos. GPx e Prxs possuem alta afinidade por H_2O_2 e ROOH, sendo ativas em baixas concentrações fisiológicas (pM a nM) desses hidroperóxidos (constantes de velocidade de reação no intervalo $10^5 – 10^7$ $M^{-1}s^{-1}$; Prxs em concentrações na ordem de mcM e superiores às concentrações de GPx).

A catalase, com menor afinidade por H_2O_2, torna-se ativa quando as concentrações deste se elevam, apresentando constante de velocidade de reação na ordem de 2 x 10^7 $M^{-1}s^{-1}$.[13, 18, 23]

A afinidade das tiol peroxidases GPx e Prxs por hidroperóxidos e a existência de múltiplas isoformas com localizações diversas tem possibilitado a percepção de que suas atividades possuem função que vai além da defesa antioxidante. Alguns resultados têm permitido considerar que essas enzimas atuam como sensores de hidroperóxidos e transdutores da sinalização redox celular, não excluindo, no entanto, a possibilidade de outras proteínas que apresentam grupos tióis menos reativos também desempenharem essa função.[21-23]

Grupos tióis na forma dissociada de tiolato em resíduos de cisteína nas proteínas (PS^-) podem ser alvos de oxidação por hidroperóxidos, gerando ácidos sulfênicos (P-SOH) que reagem efetivamente com outros grupos tióis, incluindo GSH, o que, no caso, resulta na *S*-glutationilação de proteínas (P-SSG).[21] Como resultado desse processo, ocorrem alterações alostéricas, promovendo a modificações da função proteica.[24] Esse aduto proteico com glutationa protege contra oxidações adicionais dos grupos tióis para ácidos sulfínicos ($P\text{-}SO_2H$) e sulfônicos ($P\text{-}SO_3H$), os quais são tidos como menos reversíveis ou irreversíveis.[25] Outros possíveis mecanismos de *S*-glutationilação são descritos e há controvérsias sobre a participação de enzimas catalisando o processo.[21, 26]

A *S*-glutationilação de proteínas pode ser revertida pela ação de glutarredoxinas, que, via oxidação de GSH e atividade acoplada da glutationa redutase, reduzem P-SSG para P-SH e GSH.[25] Além da ação antioxidante, a modificação da atividade de enzimas e de interações proteína-proteína e proteína-DNA pode resultar da *S*-glutationilação e desglutationilação de proteínas, o que tem papel importante na sinalização redox celular.[21, 26] A importância dessa via de sinalização tem sido comparada à da fosforilação e desfosforilação de proteínas mediadas por quinases e fosfatases, respectivamente.[26]

Em caso de oxidação adicional do resíduo de cisteína catalítico de membros de uma subfamília específica de Prxs (2-Cys Prxs típicas – Prx I a IV) para ácido sulfínico ($P\text{-}SO_2H$), sua redução é catalisada por sulfirredoxinas, em uma reação que envolve consumo de ATP. Sulfirredoxinas estão também envolvidas em reação de desglutationilação de Prx I. Entretanto, sua relevância biológica, além da ação antioxidante, ainda precisa ser esclarecida. Verifica-se que a hiperoxidação ($P\text{-}SO_2H$) de Prxs aumenta sua atividade de chaperona e impede sua atividade redutora de peróxidos, o que pode ser importante para o fluxo da sinalização redox celular. A reativação lenta da atividade peroxidásica das Prxs pela ação de sulfirredoxinas permite tempo suficiente para o fluxo do sinal, com subsequente proteção contra a oxidação excessiva de biomoléculas.[27]

Observa-se que a GSH (tripeptídeo g-L-glutamil-L-cisteinilglicina), um abundante antioxidante não enzimático hidrossolúvel encontrado em concentrações fisiológicas na faixa de 0,5 a 20 mM, é de fundamental importância para a atividade das tiol peroxidases e para as reações de *S*-glutationilação e desglutationilação com função antioxidante e de sinalização redox, conforme já descrito. Em condição de homeostase, o ambiente intracelular é redutor, contando com uma razão GSH/GSSG superior a 100. Entretanto, essa razão pode se aproximar de 1 sob condição fisiopatológica de extremo estresse oxidativo.[25]

Além de participar das reações descritas anteriormente, GSH é um importante sequestrador de radicais livres altamente reativos, como $^{\bullet}OH$, $NO_2^{\bullet}$, $CO_3^{\bullet-}$. Essas reações geram radicais tiila ($GS^{\bullet}$), que são oxidantes e, se não removidos, podem iniciar reações em cadeia, como a peroxidação lipídica. A eficácia da GSH como sequestrador de radicais livres com efeito antioxidante se deve ao fato de, na presença de O_2, a reação prosseguir no sentido de geração do radical $O_2^{\bullet-}$ pelo radical dissulfeto ($GSSG^{\bullet-}$) formado a partir da reação do radical tiila ($GS^{\bullet}$) com outra molécula de glutationa (GS^-). Os radicais $O_2^{\bullet-}$ são então removidos pela ação da SOD, gerando moléculas de H_2O_2 que são removidas pelos sistemas enzimáticos descritos anteriormente.[13] Verifica-se a necessidade da ação coordenada de antioxidantes não enzimáticos (GSH) e enzimáticos (SOD, tiol peroxidases, catalase) para que o resultado antioxidante seja atingido. Nesse sentido, alterações desse equilíbrio são prejudiciais à função antioxidante.

A GSH também está envolvida na destoxificação de moléculas eletrofílicas não radicalares, como aldeídos alfa,beta-insaturados resultantes do processo de peroxidação lipídica. A conjugação de eletrófilos com GSH pode ocorrer espontaneamente ou sob a catálise de glutationa *S*-transferases. O 4-hidroxi-trans-2-nonenal (HNE) é um dos representantes mais estudados da classe dos aldeídos alfa,beta-insaturados endogenamente formados pela oxidação de ácidos graxos poli-insaturados ômega-6 (ácido araquidônico, ácido linoleico) iniciada por radicais livres altamente reativos, como $^{\bullet}OH$. A reatividade do HNE com sítios nucleofílicos em proteínas, lipídios e ácidos nucleicos e sua ação sinalizadora têm papel benéfico quando ele está presente em baixas concentrações (submicromolar). Entretanto, quando em altas concentrações, o HNE está envolvido em mecanismos fisiopatológicos de várias condições clínicas, como dislipidemia, resistência à ação da insulina, aterosclerose, câncer e doenças neurodegenerativas. O HNE em baixas concentrações fisiológicas participa, por exemplo, da regulação da secreção de insulina e

estimula a expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes, via ativação do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (fator de transcrição designado Nrf2), como tiorredoxina redutase 1, glutationa *S*-transferase e gama-glutamil transpeptidase envolvida no metabolismo de conjugados GSH-eletrófilos na via do ácido mercaptúrico.[28, 29] Evidências da participação do HNE no desenvolvimento de doenças quando em altas concentrações têm estimulado a pesquisa de substâncias capazes de diminuir sua geração (antioxidantes com ação protetora contra a peroxidação lipídica) ou de facilitar sua destoxificação, protegendo contra a modificação excessiva de biomoléculas.[28] Ácido ascórbico,[28-30] edaravona,[28, 31] polifenóis,[29, 32-35] N-acetilcisteína, aminoguanidina, piridoxamina, hidralasina, carnosina (L-CAR e D-CAR), ácido alfa-lipoico, sulforafano e o polifenol ácido carnósico[28] são exemplos dessas substâncias.

Polimorfismos de nucleotídeo único em genes que codificam enzimas antioxidantes

Conforme o exposto, o organismo humano dispõe de um sistema antioxidante enzimático que exerce papel relevante na manutenção do estado redox celular. Alguns fatores podem influenciar a atividade desse sistema antioxidante, como a variabilidade genética dos indivíduos. A ocorrência de mutações em genes que codificam enzimas antioxidantes pode comprometer a sua atividade e favorecer o desenvolvimento de doenças por alteração da sinalização redox e oxidação de biomoléculas. Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP, *single nucleotide polymorphism*) são um dos tipos de mutação mais estudados. Eles se caracterizam pela alteração de um nucleotídeo em uma posição específica do DNA, com frequência estimada em mais de 1% da população, que pode ocorrer na região codificadora do gene – e pode ser silenciosa ou resultar em troca de aminoácidos na proteína codificada – ou na região promotora, aumentando ou reduzindo a taxa de transcrição de um gene específico, ocasionando, em ambos os casos, mudanças no fenótipo.[36] A relação entre SNP nos genes das enzimas SOD, catalase e GPx e a ocorrência de doenças será abordada a partir desse ponto.

De acordo com o banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI), até setembro de 2014 já haviam sido identificados em humanos 330 SNP no gene da CuZn-SOD (SOD1), 445 no gene da Mn-SOD (SOD2) e 206 no gene da SOD extracelular (SOD3). Entretanto, a capacidade desses polimorfismos em causar alterações fenotípicas e, especificamente, a sua associação com a ocorrência de doenças ainda é incerta.[37] Aqui serão apresentados os SNP mais estudados e tidos como relevantes para o desenvolvimento de doenças em humanos.

Algumas associações entre polimorfismos no gene da SOD1 e ocorrência de doenças já foram demonstradas. Os SNP rs1788180 (íntron 1, troca de C>T), rs2234694 (íntron 3, troca de T>C) e rs1041740 (íntron 4, troca de C>T) foram correlacionados com aumento do risco de nefropatia em pacientes com diabete tipo 1. Para o SNP rs1041740 foi observado aumento de 5,75 vezes no risco de desenvolvimento de nefropatia diabética incipiente e de 8,95 vezes no risco de nefropatia estabelecida ou avançada nos carreadores do alelo T.[38-40] O SNP rs4998557 (G7958A) foi associado com desenvolvimento de câncer gástrico em uma população chinesa. Indivíduos carreadores do alelo 7958A apresentaram aumento de 3,01 vezes no risco de desenvolver esse tipo de câncer.[41] Em alguns estudos, foi investigada a relação entre polimorfismos no gene que codifica a SOD1 e risco de câncer de mama e próstata, mas nenhuma associação foi observada.[42, 43]

Quanto à SOD2, a grande maioria dos estudos investigando a associação entre polimorfismos e risco de doenças tem como foco o SNP rs4880. Esse SNP se caracteriza pela substituição C>T na posição 2734 no éxon 2, resultando na troca do aminoácido alanina (Ala) por valina (Val) na posição 16 da proteína. Como consequência, tem-se menor estabilidade do RNA mensageiro, prejuízo do transporte da enzima precursora para o interior da mitocôndria e favorecimento de sua degradação pelo proteassoma e, portanto, prejuízo da atividade enzimática, o que justifica o grande interesse em se estudar esse polimorfismo.[44]

Os prejuízos à homeostase relacionados ao SNP rs4880 já foram avaliados em diferentes contextos e, apesar de se esperar que a presença do alelo Val represente maior risco de doenças em virtude de estar relacionado à redução da atividade enzimática, as evidências disponíveis a esse respeito apontam que, em alguns casos, o alelo Ala confere maior risco de doenças. No que diz respeito ao câncer de mama, por exemplo, existem estudos que mostram associação fraca entre a presença do alelo Ala e o aumento do risco de desenvolver a doença. Essa associação passa a ser mais significativa nos indivíduos que ingerem baixas quantidades de frutas, verduras, legumes, selênio, carotenos e vitaminas A, C e E.[45, 46] É importante considerar que a maior atividade da SOD2 implica aumento da velocidade de dismutação de $O_2^{\bullet-}$ para O_2 e H_2O_2 na matriz mitocondrial. Como explicado anteriormente, é importante que ocorra a redução enzimática coordenada das moléculas de H_2O_2 para água, pela ação de GPx, Prxs e catalase. Se a maior atividade de SOD2 não for acompanhada de maior atividade das enzimas que catalisam a redução de H_2O_2, haverá aumento da probabilidade de sua redução não enzimática para o radical $^{\bullet}OH$, altamente reativo e capaz de oxidar prontamente biomoléculas.[17, 18, 21]

No caso do câncer de próstata, encontra-se associação entre presença do alelo Ala e risco da doença somente após estratificação da população de acordo com etnia, idade, consumo de álcool e ingestão de antioxidantes por meio da alimentação.[42, 47, 48] Em se tratando especificamente da relação entre antioxidantes nutricionais, genótipo e risco de câncer, Li et al.[49] mostraram que, apesar de não haver associação direta entre o genótipo da SOD2 e o risco de câncer de próstata, existe um risco menor em indivíduos homozigotos para o alelo Ala que apresentam maiores concentrações plasmáticas dos antioxidantes selênio, licopeno e alfa-tocoferol. Além disso, a ingestão de 50 mg de betacaroteno em dias alternados (*versus* placebo) conferiu efeito protetor contra o câncer de próstata fatal nesses mesmos indivíduos quando comparados aos carreadores do alelo Val. Mikhak et al.[50] também relataram que indivíduos carreadores do alelo Ala com baixas concentrações sanguíneas de licopeno apresentaram maior risco de desenvolver câncer de próstata agressivo quando comparados aos carreadores dos demais genótipos, reforçando a importância da interação genes-nutrientes na modulação do risco de doenças.

Há, entretanto, outros estudos nos quais não foi observada relação entre o SNP rs4889 e o risco de câncer de mama e próstata. Um exemplo é o trabalho de um consórcio envolvendo nove coortes com mais de 13 mil mulheres e 8 mil homens. Nenhuma interação significativa entre as variantes genéticas da SOD2 isoladamente e a ocorrência dessas neoplasias foi encontrada. Tendo em vista o poder desse tipo de estudo, os autores consideram improvável que as interações testadas tenham efeito maior do que moderado sobre o risco de câncer de mama e próstata.[51]

Relatou-se aumento do risco de câncer de pulmão em indivíduos carreadores do alelo Val referente a esse mesmo SNP, quando associado a outros polimorfismos em genes que codificam proteínas relacionadas ao reparo do DNA.[52] A presença do alelo Val também já foi associada a maior risco de câncer de bexiga em tabagistas, de nefropatia em pacientes com diabete tipos 1 e 2 e de doença cardiovascular em mulheres com altas concentrações plasmáticas de lipoproteína de baixa densidade (LDL-c).[53-56] Outros estudos concluíram não haver associação significativa desse polimorfismo com risco de linfoma não Hodgkin, diabete, doenças hepáticas, depressão maior e transtorno bipolar.[57-60]

Considerando a importância da SOD3 como uma enzima extracelular nas vias aéreas e no parênquima pulmonar, diversos estudos têm buscado entender a relação entre variações genéticas e risco de doenças cardiopulmonares. Nesse contexto, o SNP rs1799895 (R231G) é considerado um polimorfismo relevante, que consiste na troca de citosina por guanina na posição 691, no éxon 3 do gene, o que afeta a capacidade de ligação da enzima às proteínas da matriz extracelular, resultando em um aumento da concentração de SOD3 solúvel.[61, 62] Do ponto de vista clínico, esse SNP já foi associado à redução do risco de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) à redução da gravidade da lesão pulmonar aguda relacionada à infecção e ao menor declínio da função pulmonar.[63-65] Além do rs1799895, dois SNP que ocorrem na região não codificante, rs8192287 (E1) e rs8192288 (I1), também foram associados com a gravidade de enfisema pulmonar em duas populações independentes, ressaltando a importância do genótipo da SOD3 para o risco de doenças do sistema respiratório.[66]

Outras abordagens no estudo de SNP no gene da SOD3 incluem avaliação do risco de acidente vascular encefálico (AVE) isquêmico e alguns tipos de câncer. Em estudo realizado com uma população japonesa, observou-se diferença significativa entre a frequência genotípica para os SNP rs13306703 (C34T), rs699473 (T428C) e rs2536512 (A301G) quando mulheres com diagnóstico de AVE foram comparadas a um grupo controle.[67] A importância do genótipo da SOD3 para o prognóstico do câncer de mama foi contemplada pela primeira vez em estudo demonstrando que pacientes que carreiam o alelo Thr em relação ao SNP rs2536512 apresentam maior incidência de tumores positivos para receptores de estrógeno em comparação com pacientes com o genótipo Ala/Ala. Além disso, observou-se que pacientes carreadores do alelo T referente ao SNP rs699473 apresentam menor tempo de sobrevida livre de progressão do que pacientes com o genótipo CC.[68] Associação considerada pouco robusta entre o alelo menos frequente do SNP rs699473 (C) e o aumento do risco de câncer de próstata foi observada em uma população americana.[69] Nenhuma associação significativa entre risco de câncer de pâncreas e polimorfismos no gene da SOD3 foi encontrada em estudo realizado na República Tcheca.[70]

A catalase é outra importante enzima antioxidante e variações no seu genótipo podem culminar em prejuízos à sua atividade e, eventualmente, favorecer o desenvolvimento de doenças. Foram descritos 777 SNP no gene que codifica a catalase, de acordo com o banco de dados do NCBI, dentre os quais o mais estudado quanto à associação com doenças em humanos é o rs1001179 (-262C/T). Esse é um SNP funcional, caracterizado por uma substituição C>T na posição 262 a partir do sítio de início da transcrição. Essa variação altera a ligação de fatores de transcrição, afetando a expressão basal e as concentrações de catalase quantificadas em eritrócitos.[71] Entretanto, os resultados da literatura são discrepantes quanto à relação entre o genótipo e as concentrações eritrocitárias da catalase. Alguns autores observaram concentrações significati-

vamente elevadas de catalase em indivíduos carreadores do alelo T, enquanto outros, ao avaliarem a atividade enzimática em vez da expressão proteica, sugerem que o alelo C está relacionado ao aumento da atividade da enzima.[71-73]

Apesar das controvérsias, diversos estudos foram conduzidos buscando associar esse polimorfismo com risco de câncer. O câncer de mama é o mais estudado sob esse ponto de vista, embora a maioria dos trabalhos não tenha encontrado nenhuma associação significativa, incluindo o estudo envolvendo o maior número de pacientes entre casos e controles (mais de 9 mil indivíduos), realizado em uma população do Reino Unido.[74] Em contrapartida, quando se consideram fatores como alimentação e prática de atividade física em conjunto com o componente genético, passa-se a observar relação com o risco de câncer de mama. Em uma população americana, mulheres carreadoras do genótipo C/C que consumiam mais de 10 porções de frutas por semana apresentaram risco significativamente menor de desenvolver câncer de mama.[75] Mulheres consideradas altamente ativas e que carreavam os alelos variantes (CT ou TT) apresentaram maior risco de desenvolver câncer de mama quando comparadas às carreadoras do genótipo CC.[76]

Quanto ao câncer de próstata, Choi et al.[77] demonstraram que o genótipo TT em relação ao SNP C262T relaciona-se a um aumento de duas vezes no risco dessa neoplasia em indivíduos que receberam o diagnóstico antes dos 65 anos de idade. Verificou-se também que indivíduos carreadores do genótipo CC, quando fumantes e com baixa concentração sérica de alfa-tocoferol, apresentaram maior risco de desenvolver uma forma agressiva de câncer de próstata, e esse risco era significativamente atenuado entre os indivíduos com alta concentração sérica de alfa-tocoferol, sugerindo mais uma vez a relevância da interação gene-ambiente para o risco de desenvolvimento de doenças.[78] A associação entre o SNP rs1001179 e o risco de câncer colorretal, de câncer de pulmão, de leucemia mieloide aguda e de linfoma não Hodgkin já foi estudada, mas nenhuma alteração significativa foi ainda observada.[79-82]

O SNP C262T não tem implicações apenas para o risco de câncer. Pacientes com diabete tipo 1 carreadores do alelo T desse SNP apresentam menor risco de desenvolver neuropatia diabética.[83] Em uma população na Arábia Saudita, observou-se aumento progressivo da acuidade visual, um importante parâmetro para avaliação do glaucoma primário de ângulo fechado, em pacientes carreadores dos alelos CT e TT em relação a aqueles com CC.[84] Em pacientes com diagnóstico de doença de Wilson, o SNP C262T exerce influência importante sobre o curso clínico da doença, uma vez que indivíduos homozigotos para o alelo T apresentam início mais tardio da doença propriamente dita, bem como do aparecimento dos sintomas hepáticos e neurológicos.[85]

Por fim, outra importante enzima antioxidante é a GPx. Já foram registrados no NCBI 1006 SNP nos genes que codificam cinco diferentes isoformas de GPx (1 a 5). O SNP rs1050450 é o mais estudado quanto à relação com o desenvolvimento de doenças em humanos. Esse polimorfismo é conhecido como GPx1 Pro198Leu no qual há uma troca de citosina por timina na posição 593 do gene que codifica a GPx1 (anotada na base de dados do NCBI como posição 599). Como consequência, a presença do alelo 198Leu confere menor atividade à enzima em relação ao alelo 198Pro, o que justifica o grande interesse em se estudar esse polimorfismo.[37, 86]

O risco de câncer associado ao SNP Pro198Leu foi objeto de estudo de uma metanálise contemplando 35 trabalhos publicados acerca de 12 diferentes tipos de neoplasias, com um total de 16.920 casos e 19.946 controles. Essa metanálise apontou que a atividade eritrocitária da GPx é significativamente reduzida em indivíduos carreadores do genótipo TT, quando comparados aos carreadores do genótipo CC. Nenhuma associação significativa entre o SNP e o risco de câncer foi observada nos estudos que atenderam altos critérios de qualidade, conforme ferramenta estatística empregada na metanálise. Entretanto, fortes associações foram observadas em estudos com baixos critérios de qualidade, que sugeriram aumento de risco de câncer nos carreadores do alelo T (198Leu).[87]

Outra metanálise avaliando a contribuição de doze polimorfismos em dez diferentes genes no desenvolvimento de doença coronariana mostrou que, de todos os SNP estudados, apenas o Pro198Leu se correlacionou com suscetibilidade a esse tipo de doença, sendo que a presença do alelo T esteve relacionada ao aumento do risco.[88] Associações significativas foram observadas entre o SNP Pro198Leu e o envelhecimento, bem como com o risco de asma, quando associado a outros polimorfismos, e com o risco de neuropatia periférica em diabéticos.[89-91] Em contrapartida, nenhuma relação foi encontrada quanto à ocorrência de eventos cardíacos em indivíduos com cardiomiopatia dilatada nem em estudos envolvendo pacientes com doença de Wilson e perda auditiva neurossensorial súbita.[85, 92, 93]

Os estudos descritos apontam a existência de associações entre alguns polimorfismos em genes de enzimas antioxidantes e o risco de alguns tipos de câncer, doenças cardiovasculares, complicações do diabete e envelhecimento, condições nas quais há a participação do estresse oxidativo. Entretanto, ainda não há consenso na literatura quanto à utilização desses polimorfismos para indicação de risco de desenvolvimento de doenças. Mais estudos são necessários para melhor esclarecimento das

possíveis associações. Alguns estudos mostram que fatores como alimentação, concentrações plasmáticas de antioxidantes, exercício físico e tabagismo, quando associados a determinados genótipos, influenciam significativamente o risco de doenças, ressaltando a relevância da interação gene-ambiente sobre a sua etiologia. Assim, um genótipo menos favorável do ponto de vista antioxidante poderia ser compensado pela adoção de hábitos saudáveis, incluindo alimentação rica em antioxidantes.

Antioxidantes nutricionais

Mesmo contando com o sistema de antioxidantes endógenos, o organismo necessita, evolutivamente, de antioxidantes provenientes da alimentação para o adequado equilíbrio redox.[94] Esses antioxidantes atuam de forma coordenada e sinérgica entre si e com os antioxidantes endógenos (Figura 29.1), constituindo-se em ampla possibilidade de modulação da sinalização redox e proteção contra a oxidação excessiva de biomoléculas, o que pode auxiliar na redução do risco e na terapia de doenças crônicas nas quais o estresse oxidativo esteja envolvido, como câncer, diabete e doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e oftalmológicas.[95-97] A observação de que as diversas moléculas antioxidantes atuam de forma sinérgica no organismo sugere cautela no uso das moléculas isoladas na forma de suplementos, conforme já evidenciado por ausência de proteção esperada contra doenças crônicas em estudos clínicos de intervenção.[5-9, 98] Como principais representantes desse grupo tem-se a vitamina C, a vitamina E, os polifenóis e os carotenoides, apresentados a seguir.

Ácido ascórbico (vitamina C)

O ácido ascórbico (vitamina C) é um excelente antioxidante hidrossolúvel obtido, no caso de humanos, da alimentação (frutas, verduras e legumes, como morango, goiaba, manga, frutas cítricas, kiwi, pimentas, couve-de-bruxelas, couve-flor, brócolis) e encontrado em concentrações predominantemente na faixa de 25 a 90 mcM no plasma humano[18, 29, 94, 99] e na ordem de mM em muitos tipos celulares, por exemplo 6 mM em monócitos humanos.[18, 30] A ingestão diária recomendada nos Estados Unidos é de 75 a 100 mg,[94] quantidade que permite atingir concentrações plasmáticas superiores a 50 mcM, necessárias para a saturação tecidual.[99]

Sua ação antioxidante se deve ao fato de o radical ascorbil, resultante da reação de ascorbato com uma variedade de radicais livres, ser pouco reativo e sofrer preferencialmente desproporcionação para ascorbato e dehidroascorbato.[13] O ascorbato e a GSH atuam sinergicamente na redução de radicais livres. Uma vez que o ascorbato pode interceptar radicais tiila ($GS^{\bullet}$), a GSH pode, via atividade de enzimas (p. ex., glutarredoxina), reciclar o de-hidroascorbato gerado. Essas reações contribuem para melhor efeito antioxidante em comparação ao efeito isolado do ascorbato ou da GSH.[13] Sendo o ascorbato um melhor sequestrador de radicais livres que a GSH, na presença de ambos (GSH e ascorbato), menos $O_2^{\bullet -}$ é gerado em decorrência da menor formação dos radicais tiila.[13] É importante, entretanto, considerar que o ascorbato pode reduzir íons de metais de transição, como Fe^{3+} e Cu^{2+}, e facilitar a sua participação na reação de Haber-Weiss, geradora do radical $^{\bullet}OH$ altamente reativo. Assim, pacientes com hemocromatose (sobrecarga hepática de ferro) são orientados a não ingerir suplementos com altas doses de ascorbato.[18]

Parte dos benefícios da vitamina C pode ser, no entanto, consequência de sua capacidade de modular vias de sinalização redox e fatores de transcrição, como apresentado nos Quadros 29.1 e 29.2, podendo essa modulação ser independente da sua ação antioxidante. O ácido ascórbico pode, por exemplo, inibir a atividade de NADPH oxidases, modular a fosforilação de proteínas tirosina quinases, alterar a sinalização via proteínas quinases ativadas por mitógeno (inibindo a fosforilação de MAPK p38 e JNK e ativando ERK), aumentar a atividade de HIF-1alfa hidroxilase (favorecendo a degradação do fator de transcrição designado HIF-1alfa, que apresenta aumento da sua expressão sob normoxia em diferentes tipos de câncer) e inibir a atividade dos fatores de transcrição NF-kB, AP-1 e Nrf2. Essa capacidade ajuda a entender o efeito protetor da vitamina C no tratamento da sepse, dano relacionado a hipóxia e câncer.[100]

Vitamina E

Tocoferóis e tocotrienóis (vitamina E) compreendem um grupo de moléculas lipossolúveis (isômeros alfa, beta, delta, gama de cada uma das classes) obtidas da alimentação (vegetais de folhas verdes, nozes, sementes, óleos vegetais), que se distribuem nas membranas celulares e nas lipoproteínas e apresentam, entre outras funções, a capacidade de interromper o processo radicalar de peroxidação lipídica.[18, 94] A concentração de vitamina E (razão vitamina E/ácidos graxos peroxidáveis) é variável em frações subcelulares de diferentes tecidos de animais, sendo a suscetibilidade à peroxidação lipídica inversamente proporcional a essa concentração. Microssomos de tecidos altamente oxigenados, como pulmonar e cardíaco, apresentam maiores concentrações de vitamina E e são mais resistentes à peroxidação lipídica que microssomos de fígado, rim, testículos e cérebro de diferentes animais.[131] Intracelularmente, maiores concentrações de vitamina E são encontradas nas frações microssomal e mitocondrial.[132]

Quadro 29.1 Vias de sinalização redox moduladas por antioxidantes nutricionais

Sinalização	Substâncias	Efeitos	Referências
MAPK	Licopeno	Redução da ativação de MAPK p38, ERK1/2, JNK e NF-kB, com consequente redução da expressão de genes pró-inflamatórios, ciclina D1, Bcl-2, Bcl-XL, bem como aumento da expressão de Bax, p53, p21 e p27. Efeito anti-inflamatório e anticarcinogênico	Palozza et al.[101, 102]
	Polifenóis (curcumina, resveratrol, EGCG, isoflavonas)	Isoflavonas: redução da ativação de MAPK p38 por TGF-beta, resultando em diminuição da expressão de MMP-2, podendo inibir a invasão e metástase Curcumina: redução da ativação de MAPK p38, JNK e ERK1/2. Efeito anti-inflamatório e anticarcinogênico EGCG: inibição ou ativação de MAPK p38, JNK e ERK1/2, dependendo da concentração e tipo celular Resveratrol: ativação ou inibição de MAPK e JNK e redução da ativação de ERK1/2, resultando em apoptose	Leonarduzzi et al.;[100] Sarkar et al.;[103] Roccaro et al.;[118] Woo et al.[104]
	Vitamina E (alfa-tocoferol)	Redução da ativação de MAPK p38, ERK1/2 e NFkB, o que resulta em redução da resposta inflamatória	Zingg;[105] Hammarström et al.[106]
	Vitamina C	Redução da ativação de MAPK p38 e JNK em baixas concentrações (<0,1 mM) e indução de MAPK p38 e ERK1/2 em altas concentrações (>0,3 mM)	Varadharaj et al.;[107] Pearl-Yafe et al.;[108] Kyaw et al.[109]
PKC	Betacaroteno	Inibição da inflamação quando em baixa concentração (2 mcM) e ativação quando em alta concentração (20 mcM)	Leonarduzzi et al.;[100] Yeh et al.[110]
	Polifenóis (curcumina, resveratrol, EGCG, isoflavonas e outros flavonoides)	Inibição, com consequente redução da ativação de NOX, MAPK, NF-kB, AP-1. Efeito, dependendo da concentração, anti-inflamatório e anticarcinogênico. Em algumas situações e, dependendo da concentração, é descrita ativação	Leonarduzzi et al.;[100] Garg et al.;[111] Woo et al.[104]
	Vitamina E (alfa-tocoferol)	Inibição decorrente da ativação de proteínas fosfatases, levando à redução da ativação de NOX, e da geração de ERO na microglia. Efeito anti-inflamatório e neuroprotetor Inibição com impacto na redução da proliferação em diferentes linhagens celulares. Efeito anti-inflamatório também em decorrência da redução da expressão gênica de PLA2, COX-2, 5-LOX	Leonarduzzi et al.;[100] Zingg;[105] Chan et al.;[112] Egger et al.[113]
	Vitamina C	Inibição, com consequente inativação de NOX e efeitos subjacentes, que resultam, por exemplo, em proteção da função da barreira endotelial na sepse e em cardioproteção contra danos induzidos pelo antirretroviral AZT	Han et al.;[114] Papparella et al.[115]
RAS	Licopeno	Inibição ocasionada por bloqueio da via do mevalonato, com supressão da ativação de MAPK e NF-kB, levando à parada no ciclo celular e à apoptose. Efeito anticarcinogênico	Palozza et al.[102]
	Vitamina E	Inibição com concomitante inativação de MEK/ERK e PI3K/Akt, parada no ciclo celular e apoptose	Zingg;[105] Donapaty et al.[116]
PTEN	Vitamina E	Ativação, com consequente inibição da via PI3K/Akt	Zingg[105]
PI3K/Akt	Licopeno, polifenóis (curcumina, resveratrol, EGCG, isoflavonas e outros flavonoides), vitamina E, vitamina C	Inibição, ocasionando parada no ciclo celular e apoptose. Efeito anticarcinogênico Alguns flavonoides podem levar à ativação	Leonarduzzi et al.;[100] Palozza et al.;[102] Sarkar et al.;[103] Lee et al.;[117] Roccaro et al.;[118] Zingg[105]
PTP	Vitamina E	Ativação, podendo levar à inibição de PKC	Chan et al.[112]

Os tocoferóis reduzem eficientemente radicais peroxila (–LOO$^{\bullet}$), sendo gerados radicais tocoferil pouco reativos que são reduzidos novamente a tocoferóis pela ação sinérgica do ascorbato, ou reagem com outros radicais peroxila, gerando produtos não radicalares.[18, 133] Possuem também a capacidade de suprimir fisicamente a molécula de oxigênio no estado excitado singlete ($^1O_2$).[134]

Dos isômeros existentes, o alfa-tocoferol é o mais estudado e tido como o principal antioxidante da fase lipídica, embora a importância do isômero gama-tocoferol na redução do risco da aterosclerose seja aos poucos revelada.[99, 135] Em grandes estudos epidemiológicos transversais, verificou-se que a concentração plasmática de alfa-tocoferol é negativamente correlacionada com o risco de doença cardiovascular isquêmica. Entretanto, em estudos clínicos de

Quadro 29.2 Fatores de transcrição, sensíveis à regulação redox e modulados por antioxidantes nutricionais

Fatores de transcrição	Substâncias	Efeitos	Referências
AP-1	Licopeno	Inibição, com diminuição da expressão de IL-2 e de ciclina D1 Efeito anti-inflamatório e parada no ciclo celular	Kelkel et al.;[119] Palozza et al.[101]
	Polifenóis (curcumina, resveratrol, EGCG, isoflavonas e outros flavonoides)	Inibição ou ativação, dependendo da sinalização via MAPK	Leonarduzzi et al.;[100] Woo et al.[104]
	Vitamina E	Inibição	Leonarduzzi et al.[100]
	Vitamina C	Inibição relacionada à redução da ativação de MAPK e JNK	Kyaw et al.[109]
NF-kB	Licopeno	Inibição, via efeito antioxidante ou redução da expressão de iNOS, COX-2 e da atividade de NOX e 5-LOX, diminuindo a geração de ERO e suprimindo a ativação de MAPK. Efeito anti-inflamatório Inibição via inativação de Ras e MAPK. Efeito anticarcinogênico	Armoza et al.;[120] Palozza et al.[101, 102]
	Polifenóis (curcumina, resveratrol, EGCG, isoflavonas e outros flavonoides)	Inibição, com efeito anti-inflamatório, parada no ciclo celular e apoptose. Em algumas situações é descrita ativação Resveratrol modula a transcrição e a atividade de sirtuínas, as quais desacetilam e desativam o NF-kB	Leonarduzzi et al.;[100] Sarkar et al.;[103] Garg et al.[111]
	Vitamina E (alfa-tocoferol, gama-tocotrienol), vitamina C	Inibição, com efeito anti-inflamatório e anticarcinogênico (indução de apoptose)	Leonarduzzi et al.;[100] Zingg,;[105] Hammarström et al.;[106] Cárcamo et al.[121]
p53	Licopeno, polifenóis (curcumina, resveratrol, EGCG, isoflavonas e outros flavonoides)	Aumento da expressão, concomitantemente com aumento da expressão de p21, p27 e Bax e diminuição da expressão de Bcl-2 e Bcl-XL. Indução de apoptose Alguns flavonoides podem ter efeito oposto	Leonarduzzi et al.;[100] Palozza et al.;[102] Sarkar et al.;[103] Roccaro et al.[118]
HIF	Polifenóis (curcumina, resveratrol, EGCG, isoflavonas e outros flavonoides)	Inibição da atividade, com efeitos antiangiogênico e anticarcinogênico	Leonarduzzi et al.[100]
	Vitamina E	Aumento da expressão de HIF-1 e de seus genes-alvo, como os que codificam VEGF e HO-1. Proteção contra isquemia tecidual em cultura de células neurais e renais, entretanto, efeito oposto em outros modelos celulares	Leonarduzzi et al.;[100] Katavetin et al.;[122] Zhang et al.[123]
	Vitamina C	Diminuição dos níveis, com possíveis efeitos antiangiogênico e anticarcinogênico	Zhu et al.;[124] Knowles et al.[125]
Nrf2	Carotenoides (licopeno, betacaroteno) Polifenóis (curcumina, resveratrol, EGCG, isoflavonas e outros flavonoides) Isotiocianatos (sulforafano)	Ativação, com consequente indução da expressão de enzimas antioxidantes e de biotransformação de fase II. Efeito anticarcinogênico	Kelkel et al.;[119] Leonarduzzi et al.;[100] van Breemen e Pajkovic;[126] Ben-Dor et al.;[127] Balogun et al.;[128] Talalay e Fahey;[129] Hecht[130]

suplementação com alfa-tocoferol (50-1.000 mg/dia), o benefício esperado de redução do risco de doença cardiovascular isquêmica não foi atingido, mesmo sendo obtidas as mesmas concentrações plasmáticas de alfa-tocoferol correlacionadas com menor risco nos estudos epidemiológicos. No caso, a suplementação com alfa-tocoferol pode provocar diminuição da concentração plasmática dos outros isômeros, por competição pela ligação à proteína de transferência de alfa-tocoferol hepática, e esse desequilíbrio pode prejudicar o efeito protetor da vitamina E.[135] A concentração total dos isômeros em plasma humano encontra-se predominantemente na faixa de 15 a 40 mcM[94, 99] – concentração média de alfa-tocoferol em torno de 20 a 30 mcM, de gama-tocoferol em torno de 2,5 mcM e de delta-tocoferol em torno de 0,1 mcM.[100] Nos Estados Unidos, a ingestão diária de 15 mg de vitamina E é recomendada.[94]

Concentrações plasmáticas anormalmente baixas de alfa-tocoferol ocorrem em bebês prematuros e em algu-

mas doenças (p. ex., anemias hemolíticas, doenças gastrintestinais), com aumento da suscetibilidade à peroxidação lipídica, hemólise, dano neuronal e degeneração da retina, havendo, nesses casos, benefícios decorrentes da suplementação com alfa-tocoferol.[18]

Uma série de estudos vem demonstrando, no entanto, que os efeitos benéficos da vitamina E não se devem apenas à sua função antioxidante nas biomembranas e lipoproteínas, sendo relatadas modulações de vias de sinalização e da expressão de genes por diferentes isômeros, que resultam em inibição da proliferação celular anormal, em indução de apoptose de células tumorais e em efeito anti-inflamatório, dependendo da concentração utilizada.[100] Esses efeitos estão resumidos nas Quadros 29.1 e 29.2.

Polifenóis

Frutas, legumes, verduras, ervas, especiarias, chás e vinho são fontes importantes de uma grande variedade de polifenóis, predominantemente hidrofílicos, sendo descritas mais de 500 moléculas.[32-35, 95] Uma taça de vinho pode conter cerca de 100 mg de polifenóis, enquanto uma alimentação rica em vegetais pode proporcionar mais de 100 mg por dia, resultando em altas concentrações no estômago e intestino.[18,35] Nesse grupo encontram-se os flavonoides (flavonóis, flavanóis, flavanonas, flavonas, isoflavonoides, antocianinas, proantocianidinas), os ácidos fenólicos (ácidos hidroxicinâmico e hidroxibenzoico) e os estilbenos (p. ex., resveratrol).[35]

Os polifenóis apresentam capacidade de sequestrar radicais livres, suprimir oxigênio singlete e quelar metais, sendo potentes antioxidantes *in vitro*, propriedade que varia de acordo com a posição e o número dos grupos -OH nos anéis aromáticos.[18] Estima-se que o poder antioxidante das proantocianidinas seja 20 vezes maior que o da vitamina E e 50 vezes maior que o da vitamina C.[136] Sua ação antioxidante direta *in vivo*, entretanto, é questionada em virtude das baixas concentrações plasmáticas encontradas, não ultrapassando 1 a 3 mcM no total, cerca de 1 a 2% das concentrações plasmáticas das vitaminas C e E, em razão da baixa absorção intestinal – melhor absorção é observada para quercetina (20-50% da dose) e catequinas (< 2% da dose) – e rápida biotransformação por metilação, glicuronidação e sulfação dos grupos -OH no intestino e fígado.[13, 18, 35, 94, 137] Os produtos de biotransformação apresentam menor atividade antioxidante em virtude de os grupos -OH envolvidos nessa atividade serem comprometidos nas reações de conjugação.[18, 35]

Em um estudo clínico realizado com 35 indivíduos com obesidade e síndrome metabólica nos Estados Unidos, a suplementação diária com chá-verde, correspondendo a 928 mg/dia de catequinas totais, resultou, após 8 semanas, em concentrações plasmáticas de 0,09 mcM de epigalocatequina, 0,036 mcM de epigalocatequina galato e 0,003 mcM de epicatequina galato.[34] É preciso considerar, no entanto, que no estômago e intestino as concentrações de polifenóis são altas, possibilitando nesses órgãos sua atuação pela via antioxidante e outros mecanismos, o que, indiretamente, pode melhorar a capacidade antioxidante plasmática.[18, 35] Há estudos mostrando que o consumo de bebidas e alimentos ricos em polifenóis – como chá-verde, soja, cacau, alho, cebola e suco de uva – protege contra a ocorrência de estresse oxidativo, enquanto em outros estudos tal efeito protetor não foi observado, o que, juntamente com as considerações mencionadas, não permite afirmar que essas moléculas atuem como antioxidantes diretos *in vivo*.[13, 18, 34]

Apesar das controvérsias quanto ao mecanismo de ação, estudos epidemiológicos apontam associação inversa entre a ingestão de bebidas e alimentos ricos em polifenóis e a incidência de doenças cardiovasculares, câncer e diabetes.[18, 35] No paradoxo francês, caracterizado pela baixa incidência de doenças cardiovasculares apesar do consumo elevado de ácidos graxos saturados, e na dieta mediterrânea, rica em frutas e vinho, observa-se claramente essa associação.[35] Além dos efeitos cardioprotetores, são atribuídas aos polifenóis propriedades antibacterianas, antifúngicas, antivirais, antineoplásicas, hepatoprotetoras, imunomoduladoras, anti-inflamatórias, antidiabéticas, neuroprotetoras e antienvelhecimento, com base, principalmente, em estudos em cultura de células, em animais, e epidemiológicos em humanos (revisados por Rodrigo et al.[35]). Por exemplo, o consumo moderado de vinho tinto tem sido associado à redução de até 50% do risco de desenvolvimento da doença de Alzheimer.[35] O constante consumo de bebidas e alimentos ricos em polifenóis parece ser necessário para a manutenção de concentrações plasmáticas para a observação dos efeitos benéficos. O consumo de chá-verde, por exemplo, leva a um pico da concentração plasmática de catequinas dentro de 2 horas, com declínio em 10 a 15 horas.[34] Estudos clínicos para melhor avaliação do uso terapêutico de polifenóis estão em andamento (revisados por Rodrigo et al.[35]).

Além da possível ação antioxidante direta, comprovada somente *in vitro*, polifenóis modulam atividades de enzimas, como cicloxigenases (COX-1, COX-2), lipoxigenases, telomerase e metaloproteinases, bem como apresentam ação antiestrogênica e afetam vias de sinalização celular e a expressão gênica, como apresentado resumidamente nos Quadros 29.1 e 29.2.[18, 35] Podem, no entanto, também apresentar efeitos pró-oxidantes, promovendo a formação de ERO e radicais fenoxil reativos que podem danificar biomoléculas e resultar em efeitos citotóxicos.[100]

Carotenoides

Além dos polifenóis, outros importantes metabólitos secundários de plantas associados à redução do risco de incidência de doenças crônicas em seres humanos são os carotenoides.[97, 99] Nesse grupo de pigmentos lipossolúveis, com estrutura básica de polieno com 40 átomos de carbono em duplas ligações conjugadas, encontram-se aproximadamente 700 moléculas, das quais 50 a 60 fazem parte da alimentação humana.[98, 138] Desses, os carotenos (hidrocarbonetos) betacaroteno, alfa-caroteno e licopeno, e as xantofilas (carotenoides contendo pelo menos um átomo de oxigênio) alfa-criptoxantina, beta-criptoxantina, luteína e zeaxantina são os mais abundantes, sendo betacaroteno, licopeno, luteína e zeaxantina os mais estudados. Os carotenos são mais hidrofóbicos que as xantofilas, característica que influencia a biodisponibilidade e a distribuição das diferentes moléculas no organismo, predominantemente associadas a lipoproteínas, membranas celulares e tecido adiposo.[139,140]

O consumo estimado de carotenoides a partir da alimentação é de 5 a 20 mg/dia, havendo variação na quantidade e composição de acordo com os hábitos alimentares.[138] Estão presentes em quantidades na faixa de 2 a 20 mg/100 g de algumas frutas e legumes de coloração amarelada a avermelhada (p. ex., manga, damasco, toranja, melancia, abóbora, cenoura, pimenta, tomate) e em verduras verde-escuras (p. ex., espinafre, rúcula, couve, acelga, brócolis).[138, 139] A biodisponibilidade depende, entre outros fatores, do alimento (frutas > legumes > verduras) e do modo de preparo, sendo facilitada pelo processamento mecânico (corte, homogeneização), cozimento e presença de lipídios na alimentação.[139-141] Assim como no caso dos polifenóis, as concentrações plasmáticas de carotenoides totais se encontram predominantemente no intervalo de 1,5 a 2,2 mcM, mas com meia-vida de dias a semanas em virtude da lipossolubilidade e da baixa velocidade de biotransformação e excreção.[98,99] Tanto os carotenoides precursores da vitamina A (como betacaroteno e beta-criptoxantina) quanto os não precursores (como licopeno e luteína) promovem redução do risco de doenças crônicas, sendo a ação antioxidante uma dentre as várias possíveis vias protetoras.[138]

O padrão de duplas ligações conjugadas na longa cadeia polieno faz com que os carotenoides sejam ótimos supressores físicos de oxigênio singlete ($^1O_2$), sequestradores de radicais livres (principalmente -LOO•) e desativadores de moléculas sensibilizadoras eletronicamente excitadas.[97,133,142]

A supressão física do $^1O_2$ envolve a transferência direta de sua energia para a molécula do carotenoide, tendo como produtos a molécula do O_2 no estado fundamental e a molécula de carotenoide no estado excitado triplete, que retorna ao estado fundamental dissipando a energia por interação com o meio circundante. O mesmo ocorre na desativação de sensibilizadores eletronicamente excitados.[97] As constantes de velocidade de supressão física do $^1O_2$ por carotenos e xantofilas estão na ordem de 10^9 a 10^{10} $M^{-1}s^{-1}$, dependendo do comprimento do sistema de duplas ligações conjugadas e dos grupos funcionais presentes.[134] Dos principais carotenoides encontrados no plasma humano, o licopeno é o mais eficiente na supressão de $^1O_2$, $k_q = 3,1 \times 10^{10}$ $M^{-1}s^{-1}$.[134] Uma vez que não há modificação da estrutura molecular nesse processo, uma mesma molécula de carotenoide pode passar várias vezes por esses ciclos de supressão física.[97] A eficiência dos carotenoides em suprimir $^1O_2$, somada ao conhecimento de sua compartimentalização nas membranas celulares e lipoproteínas, permite considerar que, mesmo nas concentrações submicromolares encontradas no plasma, seu papel antioxidante *in vivo* seja significativo.[134]

Além da propriedade descrita, carotenoides (como o betacaroteno), sob baixa pressão parcial de O_2 e em baixas concentrações, interrompem o processo de peroxidação lipídica, sequestrando radicais peroxila (-LOO•) e alcoxila (-LO•). Os produtos das reações são radicais dos carotenoides centrados no carbono estabilizados por ressonância, podendo ser resultantes de adição ao radical peroxila (LOOCAR•), de abstração de hidrogênio pelo radical peroxila (CAR• + LOOH) ou de transferência de elétron para o radical peroxila ($CAR^{•+}$ + LOO^-), dependendo do potencial de redução do radical sequestrado, da estrutura do carotenoide e das características do microambiente.[97, 133, 139, 143, 144] A pressão parcial de O_2 em vários tecidos humanos é inferior a 50 mmHg (50 torr) e, em células e organelas, pode ser muito inferior a 20 mmHg,[144] o que favorece a ação antioxidante dos carotenoides. Entretanto, sob elevadas pressões parciais de O_2, os carotenoides, possivelmente por sofrerem autoxidação, podem agir como pró-oxidantes e contribuir para a oxidação de biomoléculas, incluindo a propagação da peroxidação lipídica.[97, 133, 143] Pressões parciais elevadas de O_2 (acima de 100 mmHg) são encontradas no ar inspirado, no ar alveolar e no sangue arterial.[145]

Assim, carotenoides e tocoferóis/tocotrienóis desempenham papéis complementares na proteção das membranas biológicas e lipoproteínas contra a peroxidação lipídica. Enquanto os carotenoides são eficientes antioxidantes sob baixas concentrações de O_2, a vitamina E é eficiente sob pressões parciais de O_2 mais elevadas, o que pode modular a distribuição dessas moléculas nos diferentes tecidos e compartimentos celulares.[131, 133] Além da complementariedade, há interação sinérgica entre esses

antioxidantes, tendo-se verificado que, em membranas biológicas contendo alfa-tocoferol e betacaroteno, a proteção contra peroxidação lipídica é superior à esperada pela soma dos efeitos dos dois antioxidantes separadamente. De acordo com os dados experimentais, o alfa-tocoferol, somente quando presente em concentrações mais elevadas que as de betacaroteno, parece atuar na proteção contra a oxidação do betacaroteno, o que potencializaria o efeito antioxidante.[144,146]

O ácido ascórbico também pode contribuir para a redução de cátions radicais de carotenoides, regenerando carotenoides nas membranas celulares de modo semelhante à sua ação regeneradora de vitamina E. Linfócitos de indivíduos suplementados com betacaroteno (150 mg/dia), RRR-D-alfa-tocoferol (800 mg/dia) e ácido ascórbico (1.000 mg/dia) por 2 semanas apresentaram resistência à oxidação induzida por $NO_2^{\bullet}$ *in vitro* superior à esperada pela soma dos efeitos protetores dos antioxidantes individuais.[142,147]

Cátions radicais de carotenoides ($CAR^{\bullet +}$) podem ser gerados pela oxidação de carotenoides por radicais livres (p. ex., $NO_2^{\bullet}$, $RSO_2^{\bullet}$, radicais fenoxil, radicais peroxila, radicais alcoxila) e, se não forem reduzidos por outros antioxidantes, podem oxidar biomoléculas, como os aminoácidos tirosina e cisteína em proteínas.[142,148] A modulação dos efeitos anti e pró-oxidantes dos carotenoides por condições do microambiente em que se encontram (pressão parcial de O_2, presença e concentração de outros antioxidantes, estado redox) pode explicar o aumento do risco de desenvolvimento de câncer pulmonar e doenças cardiovasculares observado em tabagistas e trabalhadores expostos a asbestos suplementados com betacaroteno (20 e 30 mg/dia) pelo período de 4 a 6 anos em dois grandes estudos clínicos. Além disso, a concentração de betacaroteno no soro dos indivíduos após 3 ou 5 anos de suplementação estava 12 a 15 vezes acima da concentração encontrada nos indivíduos que não receberam o suplemento.[8,9,142,146,150]

Verificou-se em diversos estudos *in vitro* que carotenoides podem ter sua atividade antioxidante transformada em pró-oxidante com o aumento das suas concentrações intracelulares.[146,150,151] A ação do betacaroteno e de outros carotenoides na modulação do estado redox das células, podendo inibir ou ativar vias de sinalização redox em função de diversos fatores, mostra a necessidade de cautela no seu uso como suplementos em indivíduos que estejam sob condição que favoreça o estresse oxidativo, como no caso dos tabagistas e expostos a asbestos nos estudos clínicos citados anteriormente.[8,9] Nessas condições, a atividade pró-oxidante dos carotenoides, juntamente com a geração de produtos de clivagem oxidativa reativos, como apo-8'-beta-carotenal e retinal, podem promover danos em biomoléculas e alteração da expressão gênica com subsequente transformação neoplásica de células normais.[152-157] No entanto, o uso de carotenoides pode ser útil na terapia contra o câncer, sendo necessários mais estudos voltados para essa possibilidade.[158-160] A atividade pró-oxidante em células tumorais, por exemplo, pode contribuir para a inibição do crescimento tumoral por modulação de vias que causam a apoptose.[146,147,150,161,162]

Em razão de suas propriedades antioxidantes, o betacaroteno é utilizado clinicamente, desde 1975, para a prevenção da fotossensibilidade associada à protoporfiria eritropoiética, uma doença hereditária na qual há acúmulo de protoporfirina IX, uma molécula fotossensibilizadora endógena, na pele. A suplementação oral com betacaroteno melhora a tolerância dos indivíduos à radiação solar, uma vez que o carotenoide intercepta as reações de fotossensibilização geradoras de $^1O_2$.[163]

O papel benéfico de carotenoides na proteção da pele normal (fotoproteção sistêmica) contra danos decorrentes de reações foto-oxidativas é evidenciado em diversos estudos e revisões sobre o tema.[151,164-166] Esses danos à pele resultantes da exposição à radiação ultravioleta (UV) estão envolvidos no desenvolvimento de eritema, envelhecimento precoce e câncer. A suplementação oral com carotenoides (p. ex., betacaroteno, licopeno, luteína) em doses superiores a 20 mg/dia ou com extrato de tomate (40 g/dia, contendo aproximadamente 16 mg/dia de licopeno), por pelo menos 10 semanas antes da exposição à radiação, resultou em fotoproteção contra efeitos agudos na pele (Stahl et al.[167] e estudos revisados por Fernández-García,[164] e Stahl et al.[166]). Entretanto, mais estudos são necessários para avaliar melhor a segurança do uso das altas doses de carotenoides para essa finalidade, bem como para verificar se os carotenoides apresentam algum papel na proteção da pele contra efeitos crônicos da exposição à radiação UV, como o desenvolvimento de câncer.[158,168]

A proteção contra o dano foto-oxidativo oferecida pelos carotenoides também é importante para diminuir o risco de desenvolvimento de doenças oftalmológicas, como catarata (estudos revisados por Weikel et al.[169]) e degeneração macular relacionada à idade.[170,171] Os principais carotenoides encontrados no cristalino e na retina (pigmento macular) são luteína e zeaxantina. Na retina, o pigmento macular absorve a luz azul (~440 nm), diminuindo a quantidade que chega aos fotorreceptores, e atua como fotoprotetor. É evidenciado em estudos epidemiológicos que indivíduos com alimentação rica em luteína e zeaxantina, com altas concentrações desses carotenoides no soro ou com altos níveis de pigmento macular, apresentam menor risco de degeneração macular avançada relacionada à idade (estudos revisados por Koushan et al.,[170] e Landrum e Bone[171]).

Os carotenoides, tanto em virtude das suas propriedades anti e pró-oxidantes com potencial de modulação do estado redox das células como por vias independentes da modulação redox, afetam a expressão gênica.[100]

Dentre todos os carotenoides, cerca de 50 apresentam atividade pró-vitamina A, sendo o betacaroteno-todo-*trans* o principal carotenoide presente na alimentação humana com essa atividade.[152] Uma molécula de betacaroteno-todo-*trans* gera duas moléculas de retinal-todo-*trans* ao sofrer clivagem oxidativa na ligação central C_{15}=$C_{15'}$, catalizada pela enzima betacaroteno-15,15'-monoxigenase em diversos tecidos (como intestino, tecido adiposo e células epiteliais do pigmento da retina). SNP no gene que codifica essa enzima alteram a eficiência de conversão de betacaroteno para retinal. Enzimaticamente, o retinal-todo-*trans* pode ser reduzido para retinol-todo-*trans* (vitamina A) ou oxidado para ácido retinoico-todo-*trans*.[152] O metabolismo ocorre em uma sequência controlada a partir do intestino, com incorporação de ésteres de retinil em quilomícrons, passando pelo fígado, até as células-alvo, com a participação da proteína ligadora de retinol (RBP), das proteínas celulares ligadoras de retinol (CRBP) e das proteínas celulares ligadoras de ácido retinoico.[172]

A vitamina A é essencial para o crescimento e o desenvolvimento normal de fetos e crianças, para a reprodução, para adequada função do sistema imune, para a manutenção de tecidos epiteliais e para a visão.[173] Além do betacaroteno, alimentos de origem animal, como fígado, ovos, leite e derivados, são fontes diretas de vitamina A (na forma de retinol todo-*trans* e ésteres de retinil). É preciso considerar o fato de que o consumo diário de vitamina A (vitamina A + pró-vitamina A) abaixo e acima dos valores recomendados para diferentes faixas etárias, estágios da gestação e período da lactação pode ser prejudicial à saúde.[152] Sua deficiência durante a gestação, por exemplo, pode resultar em malformações congênitas, afetando olhos, miocárdio, diafragma e sistemas respiratório e urogenital.[173]

O ácido retinoico é essencial para a modulação de vias bioquímicas envolvidas no desenvolvimento embrionário, na diferenciação, na proliferação celular e na apoptose.[172] Os isômeros todo-*trans* e *9-cis* ligam-se aos receptores nucleares de ácido retinoico (RAR) envolvidos na regulação da transcrição gênica. O isômero ácido retinoico *9-cis* se liga, também no núcleo, aos receptores X de ácido retinoico (RXR).[152,172] Para a atividade biológica, é necessária a heterodimerização de um RAR com um RXR. O dímero se liga a regiões específicas do DNA conhecidas como elementos de resposta ao ácido retinoico (RARE). Como ambos os receptores estão presentes em diferentes subtipos e isoformas (RARalfa1, RARalfa2, RARbeta1', RARbeta1, RARbeta2, RARbeta3, RARbeta4, RARgama1, RARgama2, RXRalfa1, RXRalfa2, RXRbeta1, RXRbeta2, RXRgama1, RXRgama2), os dímeros podem ter composição bastante variável. Além disso, RXR podem heterodimerizar com outros receptores nucleares (não RAR). A atividade dos dímeros é, ainda, modulada pela ligação adicional de coativadores e correpressores, incluindo enzimas com atividades de acetilação e desacetilação de histonas, tendo como resultado a expressão ou o silenciamento gênico. Essas vias intrincadas de controle da expressão gênica são importantes para embriogênese, crescimento, reprodução, visão e proteção contra doenças, como diferentes tipos de câncer, alterações metabólicas (obesidade, diabete, síndrome metabólica), doenças neurodegenerativas e doença renal.[152]

A capacidade de modulação da expressão gênica não se restringe, no entanto, aos carotenoides com atividade pró-vitamina A. O licopeno, por exemplo, além das suas propriedades anti e pró-oxidantes, modula vias de sinalização celular de modo a elevar a expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes, a aumentar a comunicação intercelular via junções comunicantes (aumenta a expressão de conexina-43), a diminuir a inflamação, a promover parada no ciclo celular e apoptose,[119] como apresentado nos Quadros 29.1 e 29.2. Essas propriedades têm incentivado a realização de estudos clínicos para avaliar a importância do licopeno na quimioprevenção e no tratamento do câncer, principalmente de próstata, tecido de maior acúmulo de licopeno em humanos.[174]

ERO e antioxidantes nutricionais na modulação de vias de sinalização celular e expressão gênica

Como apresentado no início do capítulo e na Figura 29.1, as ERO (principalmente H_2O_2) podem oxidar grupos tióis, na forma dissociada para tiolato, de resíduos de cisteína em proteínas (PS^-).[21] Várias proteínas intracelulares são sensíveis a esse tipo de oxidação por hidroperóxidos, sofrendo alterações reversíveis, como dimerização, formação de pontes dissulfeto intramolecular ou glutationilação, mecanismos básicos que explicam a modulação da sinalização celular por ERO. Em caso de excesso de ERO, podem ocorrer, ainda, hiperoxidações irreversíveis ($-SO_2H$, $-SO_3H$). Atualmente, sabe-se que a sinalização redox está envolvida em diversas vias (Figura 29.2) que controlam o metabolismo, a proliferação, a diferenciação, a migração celular e a apoptose.[22] Assim, a relação entre estresse oxidativo, envelhecimento e doenças crônicas não transmissíveis, como câncer, diabete, doenças cardiovasculares, artrite reumatoide e doenças neurodegenerativas pode ser explicada não só em termos de dano oxidativo a biomoléculas, mas também considerando a perda da homeostase da sinalização redox celular.[19]

Proteínas serina/treonina quinases (quinase 1 reguladora do sinal de apoptose – ASK1, MAPK, proteínas quinases C – PKC), Ras, tirosina/lipídio fosfatase e homólogo da tensina (PTEN), e proteínas tirosina fosfatases (PTP) são exemplos de proteínas sinalizadoras cujas atividades são reguladas por reações de oxidação e redução de resíduos de cisteína[19,22,100,175] (Figura 29.2). Fatores de transcrição, como AP-1, NF-kB, p53, HIF e Nrf2, também fazem parte do grupo de proteínas passíveis de regulação redox[19,100,176] (Figura 29.2). A regulação da atividade é complexa e pode envolver a ligação de diversas proteínas à proteína-alvo e modificações pós-traducionais, como fosforilação, nitrosilação, ubiquitinação, farnesilação, além de oxidação ou redução, de modo que a resposta não depende apenas da presença ou ausência do estímulo, mas também da sua intensidade e duração.[22] Assim, apesar de existirem estudos *in vitro* e em animais experimentais mostrando que antioxidantes nutricionais antagonizam os efeitos de ERO nas vias de sinalização e de fatores de transcrição sensíveis à regulação redox, há ainda muitos resultados contraditórios, como revisado por Leonarduzzi et al.,[100] sendo necessários mais estudos para melhor compreensão dos mecanismos moleculares de regulação dessas vias.[22]

A família das MAPK inclui as vias das quinases reguladas por sinal extracelular (ERK1, ERK2), JNK e p38 MAPK, que estão envolvidas na regulação de processos celulares, como resposta a estresse, proliferação, migração, diferenciação e apoptose.[22,100] Essas vias consistem em três cas-

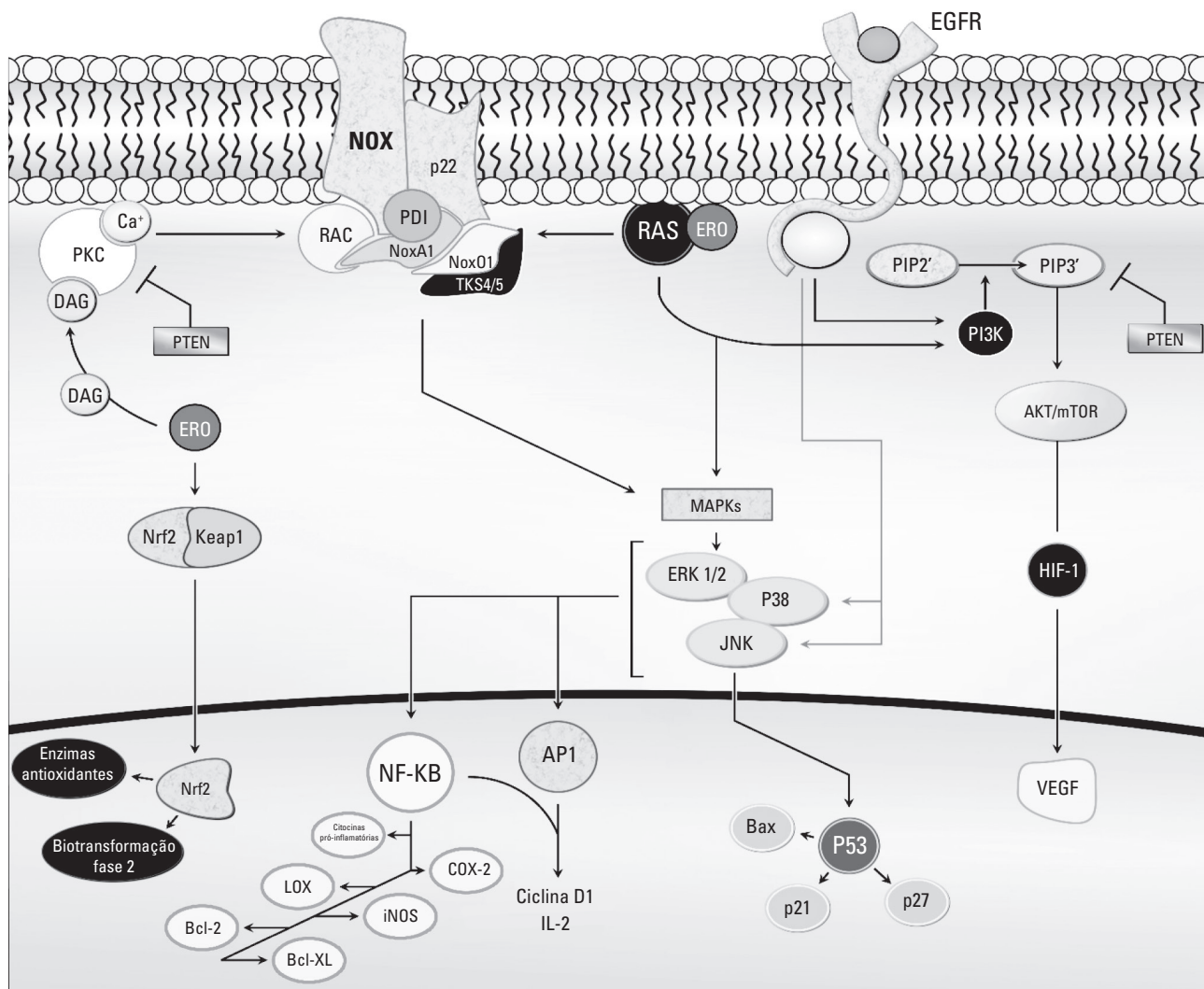



Figura 29.2 Vias de sinalização celular e fatores de transcrição modulados por espécies reativas de oxigênio (ERO). AKT/mTOR: *protein kinase B/mammalian target of rapamycin*; AP1: proteína ativadora 1; Bax: *BCL2 associated X protein*; Bcl-2: *B-cell lymphoma 2*; Bcl-XL: *B-cell lymphoma extra large*; Ca^{+}: cálcio; COX-2: cicloxigenase 2; DAG: diacilglicerol; EGFR: receptor do fator de crescimento epidérmico; ERK: quinase regulada por sinal extracelular; HIF-1: fator induzível por hipóxia; IL: interleucina; iNOS: óxido nítrico sintase induzível; JNK: *c-Jun N-terminal kinase*; Keap1: *kelch like ECH associated protein 1*; LOX: lipoxigenase; MAPK: proteínas quinases ativadas por mitógenos; NF-kB: fator nuclear kappa B; NOX/p22/PDI/NoxA1/NoxO1/RAC/TKS4/5: complexo enzimático da NADPH oxidase; Nrf2: fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2; P38: P38 mitogen-activated protein kinase; PI3K: fosfatidilinositol-3-quinase; PIP2': fosfatidil inositol bifosfato; PIP3': fosfatidil inositol trifosfato; PKC: proteína quinase C; PTP: proteína tirosina fosfatase; PTEN: tirosina/lipídio fosfatase e homólogo da tensina; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular.

catas de quinases ativadas sequencialmente: MAPKKK, MAPKK e MAPK. O equilíbrio decorrente da ativação simultânea ou sequencial de múltiplas vias define o destino da célula.[22] A proteína ASK1 pertence à família MAPKKK e, quando ativada (p. ex., por ERO, sobrecarga de cálcio, citocinas inflamatórias), fosforila e ativa as vias apoptóticas JNK e p38. Entretanto, em algumas situações, pode também promover a sobrevivência, diferenciação e proliferação celular. A sinalização pelas vias ERK1 e ERK2, por outro lado, resulta, em geral, na sobrevivência celular, diferenciação e proliferação, mas em algumas situações pode também estimular a apoptose.[22] As diferentes cascatas podem ser ativadas por receptores tirosina quinases (p. ex., receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas – PDGFR; receptor do fator de crescimento epidérmico – EGFR), por outras proteínas tirosina quinases, por receptores de citocinas e por receptores acoplados à proteína G.[101]

As PKC podem modular a apoptose e a sobrevivência celular via regulação da MAPK. Diferentes isoformas de PKC estão implicadas também na ativação da NADPH oxidase, sendo esta uma via importante de indução de estresse oxidativo na condição de diabete.[100]

A Ras (proteína G) é outra proteína que pode mediar a ativação da NADPH oxidase e está envolvida na ativação de MAPK. Quando ativada por ERO, a Ras recruta fosfatidil inositol 3 quinase (PI3K), o que leva à ativação das vias Akt e MAPK. Estudos com diferentes tipos de células mostram que a ativação da Ras promove sinalização via Raf/ERK, a qual favorece sobrevivência, crescimento e replicação celular, em detrimento da apoptose, e está envolvida no processo de tumorigênese.[100]

O recrutamento e a ativação de PI3K pela Ras promovem a fosforilação do grupo 3'-hidroxila do fosfatidil inositol bifosfato, gerando fosfatidil inositol trifosfato (PIP-3) na membrana plasmática. Tais lipídios passam então a recrutar/ativar as serina/treonina quinases Akt e mTor, resultando em alterações metabólicas que levam à biossíntese e à replicação celular. A via PI3K/Akt/mTor é comumente alterada em diversos tipos de câncer humano. A ativação do sistema PI3K é controlada pela desfosforilação da posição 3' do PIP3, catalisada pela fosfatase PTEN, que, quando oxidada por ERO, não exerce sua atividade.[22,177,178] Assim, o aumento da sinalização via Ras e a perda da atividade da PTEN na presença de ERO favorecem o crescimento e a replicação celular.

As PTP estão envolvidas na regulação da atividade de proteínas tirosina quinases e são inibidas por ERO, o que promove a ativação, por exemplo, de PDGFR, EGFR e das vias de sinalização de crescimento subjacentes.[100]

Verifica-se, portanto, que, modulando as vias de sinalização citadas, ERO podem promover crescimento e replicação celular ou parada do ciclo e morte celular. O destino possivelmente depende da fonte de ERO, da localização e da concentração. Assim, baixas concentrações de ERO (nM) estão relacionadas à indução de crescimento, replicação e diferenciação, enquanto maiores concentrações (mcM) estão relacionadas à indução de morte celular.[176]

Entre os fatores de transcrição, o AP-1 é um complexo de proteínas Jun e Fos que controla a expressão de genes relacionados à sobrevivência e à proliferação celular. Na presença de fatores de crescimento, o AP-1 é ativado pela fosforilação de c-Jun e c-Fos por ERK1/2 da via de sinalização das MAPK, sendo induzida a expressão de ciclina D1 para que as células entrem em divisão. Sob estresse oxidativo, a c-Jun é oxidada e sofre glutationilação no sítio de ligação ao DNA, o que reprime a transcrição de ciclina D1 e promove parada no ciclo.[176] Observa-se que o controle da transcrição de genes ocorre em diferentes níveis, sendo que as alterações redox intracelulares representam papel relevante na regulação de diferentes vias de sinalização.

O fator de transcrição NF-kB regula a expressão de centenas de genes envolvidos na apoptose, na adesão celular, na proliferação, na resposta ao estresse, no remodelamento tecidual, na resposta inflamatória e na resposta imune.[179] São cinco os membros dessa família que se arranjam em diferentes complexos. Os complexos de NF-kB são mantidos inativos no citoplasma por uma família de proteínas inibidoras do NF-kB (IkB). A ativação envolve a fosforilação de IkB pelo complexo IkB quinase (IKK-alfa/IKK-beta e uma subunidade regulatória NEMO/IKK-gama) nas vias dependentes de citocinas, ou por proteína tirosina quinase na via ativada por ERO, que resulta na degradação de IkB e na liberação do NF-kB, que é translocado para o núcleo.[179] A IKK-beta pode ser oxidada e glutationilada em resíduo de cisteína, resultando em inibição da atividade de fosforilação do IkB e, consequentemente, em inibição de algumas das vias ativadas pelo NF-kB.[176] O controle da expressão gênica pelo NF-kB é bastante complexo e depende da atividade coordenada de outros fatores de transcrição e vias de sinalização, podendo resultar em ativação ou repressão da transcrição, dependendo do contexto de sua indução.[179] Além do complexo sistema de ativação que ocorre no citoplasma, que, entre outros fatores, pode ser desencadeado por ERO, o NF-kB (subunidades p50 e RelA) pode sofrer oxidação e glutationilação em resíduos de cisteína, o que resulta em inibição de sua ligação ao DNA.[176]

O fator nuclear p53 tem importante função como supressor de tumor, regulando a parada do ciclo celular e o reparo do DNA ou induzindo apoptose. Mutações inativadoras do p53 estimulam o crescimento e a proliferação celular e são encontradas em muitos tipos de câncer.[180] Al-

gumas proteínas cujas expressões são moduladas pelo p53 são p21/WAF1, MDM2, BAX, GADD45 e p53R2, as quais são importantes para os efeitos relacionados à expressão do p53. Por exemplo, a parada do ciclo celular na fase G1 não ocorre na ausência de p21/WAF1 funcional, mesmo com a expressão normal de p53.[180] A atividade do p53 pode ser regulada por fosforilação pelas MAPK JNK e p38. Além disso, na presença de ERO, a capacidade de ligação do p53 e do p21 ao DNA pode ser afetada pela oxidação de resíduos de cisteína nos domínios de ligação ao DNA.[22,100]

O fator de transcrição HIF é ativado pela via PI3K/Akt/mTor e promove a adaptação das células a baixas tensões de oxigênio, induzindo neovascularização e glicólise, dentre outros efeitos relacionados à indução de mais de 50 genes responsivos à hipóxia. Os complexos HIF1 e HIF2 são heterodímeros compostos por uma subunidade expressa constitutivamente, a HIF1-beta, e as subunidades HIF1-alfa ou HIF2-alfa, as quais são rapidamente estabilizadas sob hipóxia e estresse oxidativo. A HIF1-alfa é a subunidade mais expressa, com efeitos metabólicos mais bem caracterizados. Mutações ou alterações metabólicas e epigenéticas que promovem a estabilização da HIF-alfa na presença de oxigênio fazem com que a proteína HIF permaneça ativa, alterando as características metabólicas da célula sob normoxia, o que pode ter efeito tumorigênico.[181-183]

A condição de estresse oxidativo promove a ativação da resposta ao estresse. O fator de transcrição Nrf2 é ativado por ERO e induz a expressão de genes que estão sob controle do elemento de resposta a antioxidantes (ERA), como glutationa-S-transferase, gama-glutamilcisteína sintetase, glutationa redutase, glutationa peroxidase, peroxirredoxina, tiorredoxina, tiorredoxina redutase, catalase, SOD, sulfirredoxina e enzimas de biotransformação de fase II. Em ambiente redutor, o Nrf2 é mantido no citoplasma ligado à proteína inibidora KEAP1. Sob estresse oxidativo, a proteína KEAP1 é oxidada em um resíduo de cisteína e se dissocia do Nrf2, o qual é translocado para o núcleo e inicia a transcrição dos genes. O sistema antioxidante, ao controlar a disponibilidade de ERO, contribui para a modulação das vias de sinalização redox, de modo que haja equilíbrio adequado para o ciclo normal das células.[176] A indução de enzimas de biotransforação de fase II contribui para a quimioprevenção do câncer.[130]

Diversos estudos têm revelado que antioxidantes nutricionais podem modular vias de sinalização celular e expressão gênica. Nos Quadros 29.1 e 29.2 são apresentados efeitos da vitamina C, vitamina E, polifenóis e carotenoides nas atividades das vias de sinalização redox e dos fatores de transcrição citados.

É importante ressaltar também que muitas substâncias antioxidantes apresentam a capacidade de alterar vias epigenéticas de controle da expressão gênica, modulando a atividade de histonas acetil transferases (HAT), de desacetilases de histonas (HDAC), de DNA metiltransferases (DNMT) e a expressão de microRNA, tendo como resultado, por exemplo, efeitos antineoplásicos.[184-189]

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os alimentos são fontes importantes de grande variedade de substâncias capazes de modular vias de sinalização redox em células e, consequentemente, a expressão de diversas proteínas envolvidas em processos inflamatórios, resposta a estresse, proliferação, crescimento, diferenciação e morte celular. Sabe-se atualmente que as substâncias conhecidas como antioxidantes (vitamina C, vitamina E, polifenóis, carotenoides) participam de reações no organismo que vão além do importante papel de sequestro de ERO e ERN e proteção contra oxidação excessiva de biomoléculas. O conhecimento dos mecanismos dessas reações, de possíveis interações com sistemas antioxidantes endógenos e dos fatores interferentes auxiliará a intervir mais eficientemente no curso do envelhecimento e de diferentes doenças crônicas, eventos nos quais o estresse oxidativo está envolvido. Estudos epidemiológicos apontam, por exemplo, que uma alimentação rica em antioxidantes é capaz de reduzir o risco de doenças crônicas não transmissíveis em indivíduos com polimorfismos em genes que codificam algumas enzimas antioxidantes.

Muitos antioxidantes nutricionais podem interagir diretamente com proteínas em vias de sinalização na expressão gênica, modificando o fenótipo celular. Apresentam também importante papel na quimioprevenção, uma vez que regulam positivamente o sistema antioxidante endógeno e de destoxificação de moléculas reativas (biotransformação de fase II). Podem, ainda, dependendo de suas concentrações e das condições do microambiente em que se encontram, atuar como pró-oxidantes.

Um adequado equilíbrio entre os antioxidantes nutricionais no organismo é importante para a manutenção da saúde e frutas, legumes, verduras, especiarias, ervas, chás e vinho são as principais fontes dessas moléculas. Até o momento, grande parte dos estudos clínicos de intervenção com moléculas antioxidantes isoladas ou algumas associações falhou em alcançar os benefícios esperados com base nos estudos epidemiológicos que mostram relação inversa entre o consumo de alimentos e bebidas ricos em antioxidantes e a incidência de doenças crônicas não transmissíveis. A verificação de que os antioxidantes nutricionais atuam de forma complementar, coordenada e sinérgica entre si e com o sistema antioxidante endógeno para manutenção do equilíbrio redox nas células aju-

da a entender as contradições observadas nesses estudos e denota um complexo cenário a ser desvendado, visando à redução do risco e terapia de doenças.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Neuhouser ML, Patterson RE, Thornquist MD, Omenn GS, King IB, Goodman GE. Fruits and vegetables are associated with lower lung cancer risk only in the placebo arm of the beta-carotene and retinol efficacy trial (CARET). Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2003;12:350-58.
2. Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. Nat Rev Cancer. 2003;3:768-80.
3. van Poppel G. Epidemiological evidence for beta-carotene in prevention of cancer and cardiovascular disease. Eur J Clin Nutr. 1996;50(Suppl 3):S57-61.
4. Weisburger JH. Nutritional approach to cancer prevention with emphasis on vitamins, antioxidants, and carotenoids. Am J Clin Nutr. 1991;53:226S-237S.
5. Bjelakovic G, Nikolova D, Simonetti RG, Gluud C. Antioxidant supplements for prevention of gastrointestinal cancers: a systematic review and meta-analysis. Lancet. 2004;364:1219-28.
6. Vivekananthan DP, Penn MS, Sapp SK, Hsu A, Topol EJ. Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of randomised trials. Lancet. 2003;361:2017-23.
7. Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF Heart Protection Study of antioxidant vitamin supplementation in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. Lancet. 2002;360:23-33.
8. The Alpha-Tocopherol Beta-Carotene Cancer Prevention Study Group. The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. The Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group. N Engl J Med. 1994;330:1029-35.
9. Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A et al. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. N Engl J Med. 1996;334:1150-55.
10. Jones DP. Redefining oxidative stress. Antioxid Redox Signal. 2006;8:1865-79.
11. Allen RG, Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. Free Radic Biol Med. 2000;28:463-99.
12. Azzi A. Oxidative stress: A dead end or a laboratory hypothesis? Biochem Biophys Res Commun. 2007;362:230-32.
13. Winterbourn CC. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. Nat Chem Biol. 2008;4:278-86.
14. Halliwell B. Free radicals and antioxidants - quo vadis? Trends Pharmacol Sci. 2011;32:125-30.
15. Azzi A, Davies KJ, Kelly F. Free radical biology - terminology and critical thinking. FEBS Lett. 2004;558:3-6.
16. Murphy MP, Holmgren A, Larsson NG, Halliwell B, Chang CJ, Kalyanaraman B et al. Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. Cell Metab. 2011;13:361-66.
17. Bartosz G. Reactive oxygen species: destroyers or messengers? Biochem Pharmacol. 2009;77:1303-15.
18. Halliwell B, Gutteridge J. Free radicals in biology and medicine. Oxford: Bioscience; 2007.
19. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol. 2007;39:44-84.
20. Augusto O. Radicais livres: bons, maus e naturais. São Paulo: Oficina de Textos; 2006.
21. Forman HJ, Ursini F, Maiorino M. An overview of mechanisms of redox signaling. J Mol Cell Cardiol. 2014;73:2-9.
22. Lee S, Kim SM, Lee RT. Thioredoxin and thioredoxin target proteins: from molecular mechanisms to functional significance. Anti-oxid Redox Signal. 2013;18:1165-207.
23. Marinho HS, Real C, Cyrne L, Soares H, Antunes F. Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. Redox Biol. 2014;2:535-62.
24. Schieber M, Chandel NS. ERO function in redox signaling and oxidative stress. Curr Biol. 2014;24:R453-62.
25. Shelton MD, Chock PB, Mieyal JJ. Glutaredoxin: role in reversible protein S-glutathionylation and regulation of redox signal trans-duction and protein translocation. Antioxid Redox Signal. 2005;7:348-66.
26. Popov D. Protein S-glutathionylation: from current basics to targeted modifications. Arch Physiol Biochem. 2014;120:123-30.
27. Jeong W, Bae SH, Toledano MB, Rhee SG. Role of sulfiredoxin as a regulator of peroxiredoxin function and regulation of its expres-sion. Free Radic Biol Med. 2012;53:447-56.
28. Aldini G, Carini M, Yeum KJ, Vistoli G. Novel molecular approaches for improving enzymatic and nonenzymatic detoxification of 4-hydroxynonenal: toward the discovery of a novel class of bioactive compounds. Free Radic Biol Med. 2014;69:145-56.
29. Kuiper HC, Bruno RS, Traber MG, Stevens JF. Vitamin C supplementation lowers urinary levels of 4-hydroperoxy-2-nonenal metabolites in humans. Free Radic Biol Med. 2011;50:848-53.
30. Miranda CL, Reed RL, Kuiper HC, Alber S, Stevens JF. Ascorbic acid promotes detoxification and elimination of 4-hydroxy-2(E)-nonenal in human monocytic THP-1 cells. Chem Res Toxicol. 2009; 22:863-74.
31. Xi H, Akishita M, Nagai K, Yu W, Hasegawa H, Eto M et al. Potent free radical scavenger, edaravone, suppresses oxidative stress-induced endothelial damage and early atherosclerosis. Atherosclerosis. 2007;191:281-89.
32. Basu A, Newman ED, Bryant AL, Lyons TJ, Betts NM. Pomegranate polyphenols lower lipid peroxidation in adults with type 2 diabe-tes but have no effects in healthy volunteers: a pilot study. J Nutr Metab. 2013;708381.
33. Hügel HM, Jackson N. Redox chemistry of green tea polyphenols: therapeutic benefits in neurodegenerative diseases. Mini Rev Med Chem. 2012;12:380-87.
34. Basu A, Sanchez K, Leyva MJ, Wu M, Betts NM, Aston CE et al. Green tea supplementation affects body weight, lipids, and lipid peroxidation in obese subjects with metabolic syndrome. J Am Coll Nutr. 2010;29:31-40.
35. Rodrigo R, Miranda A, Vergara L. Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. Clin Chim Acta. 2011;412:410-24.
36. Forsberg L, De Faire U, Morgenstern R. Oxidative stress, human genetic variation, and disease. Arch Biochem Biophys. 2001a;389:84-93.
37. Crawford A, Fassett RG, Geraghty DP, Kunde DA, Ball MJ, Robertson IK et al. Relationships between single nucleotide polymorphisms of antioxidant enzymes and disease. Gene. 2012;501:89-103.
38. Mohammedi K, Maimaitiming S, Emery N, Bellili-Munoz N, Roussel R, Fumeron F et al. Allelic variations in superoxide dismutase-1 (SOD1) gene are associated with increased risk of diabetic nephropathy in type 1 diabetic subjects. Mol Genet Metab. 2011;104:654-60.

39. Panduru NM, Cimponeriu D, Cruce M, Ion DA, Mota E, Mota M et al. Association of +35A/C (intron3/exon3) polymorphism in SOD1-gene with diabetic nephropathy in type 1 diabetes. Rom J Morphol Embryol. 2010;51:37-41.
40. Al-Kateb H, Boright AP, Mirea L, Xie X, Sutradhar R, Mowjoo-di A et al. Multiple superoxide dismutase 1/splicing factor serine ala-nine 15 variants are associated with the development and progression of diabetic nephropathy: the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Genetics study. Diabetes. 2008;57:218-28.
41. Yi JF, Li YM, Liu T, He WT, Li X, Zhou WC et al. Mn-SOD and CuZn-SOD polymorphisms and interactions with risk factors in gastric cancer. World J Gastroenterol. 2010;16:4738-46.
42. Kang D, Lee KM, Park SK, Berndt SI, Reding D, Chatterjee N et al. Lack of association of transforming growth factor-beta1 polymorphisms and haplotypes with prostate cancer risk in the prostate, lung, colorectal, and ovarian trial. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2007;16:1303-5.
43. Oestergaard MZ, Tyrer J, Cebrian A, Shah M, Dunning AM, Ponder BA et al. Interactions between genes involved in the antioxidant defence system and breast cancer risk. Br J Cancer. 2006;95:525-31.
44. Sutton A, Imbert A, Igoudjil A, Descatoire V, Cazanave S, Pessayre D et al. The manganese superoxide dismutase Ala16Val dimor-phism modulates both mitochondrial import and mRNA stability. Pharmacogenet Genomics. 2005;15:311-19.
45. Cai Q, Shu XO, Wen W, Cheng JR, Dai Q, Gao YT et al. Genetic polymorphism in the manganese superoxide dismutase gene, antioxidant intake, and breast cancer risk: results from the Shanghai Breast Cancer Study. Breast Cancer Res. 2004;6:R647-55.
46. Amberoone CB, Freudenheim JL, Thompson PA, Bowman E, Vena JE, Marshall JR et al. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) genetic polymorphisms, dietary antioxidants, and risk of breast cancer. Cancer Res. 1999;59:602-6.
47. Iguchi T, Sugita S, Wang CY, Newman NB, Nakatani T, Haas GP. MnSOD genotype and prostate cancer risk as a function of NAT genotype and smoking status. In Vivo. 2009;23:7-12.
48. Arsova-Sarafinovska Z, Matevska N, Petrovski D, Banev S, Dzikova S, Georgiev V et al. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) genetic polymorphism is associated with risk of early-onset prostate cancer. Cell Biochem Funct. 2008;26:771-77.
49. Li H, Kantoff PW, Giovannucci E, Leitzmann MF, Gaziano JM, Stampfer MJ et al. Manganese superoxide dismutase polymorphism, prediagnostic antioxidant status, and risk of clinical significant prostate cancer. Cancer Res. 2005;65:2498-504.
50. Mikhak B, Hunter DJ, Spiegelman D, Platz EA, Wu K, Erdman JW Jr et al. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism, interactions with carotenoid levels and prostate cancer risk. Carcinogenesis. 2008;29:2335-40.
51. Blein S, Berndt S, Joshi AD, Campa D, Ziegler RG, Riboli E et al. Factors associated with oxidative stress and cancer risk in the Breast and Prostate Cancer Cohort Consortium. Free Radic Res. 2014;48:380-86.
52. Liu G, Zhou W, Park S, Wang LI, Miller DP, Wain JC et al. The SOD2 Val/Val genotype enhances the risk of nonsmall cell lung car-cinoma by p53 and XRCC1 polymorphisms. Cancer. 2004;101:2802-8.
53. Mollsten A, Marklund SL, Wessman M, Svensson M, Forsblom C, Parkkonen M et al. A functional polymorphism in the manganese superoxide dismutase gene and diabetic nephropathy. Diabetes. 2007;56:265-69.
54. Hung RJ, Boffetta P, Brennan P, Malaveille C, Gelatti U, Placidi D et al. Genetic polymorphisms of MPO, COMT, MnSOD, NQO1, interactions with environmental exposures and bladder cancer risk. Carcinogenesis. 2004;25:973-78.
55. Kakko S, Paivansalo M, Koistinen P, Kesaniemi YA, Kinnula VL, Savolainen MJ. The signal sequence polymorphism of the MnSOD gene is associated with the degree of carotid atherosclerosis. Atherosclerosis. 2003;168:147-52.
56. Nomiyama T, Tanaka Y, Piao L, Nagasaka K, Sakai K, Ogihara T et al. The polymorphism of manganese superoxide dismutase is associated with diabetic nephropathy in Japanese type 2 diabetic patients. J Hum Genet. 2003;48:138-41.
57. Lee SJ, Choi MG. Association of manganese superoxide dismutase gene polymorphism (V16A) with diabetic macular edema in Kore-an type 2 diabetic patients. Metabolism. 2006;55:1681-88.
58. Pae CU, Yoon SJ, Patkar A, Kim JJ, Jun TY, Lee C et al. Manganese superoxide dismutase (MnSOD: Ala-9Val) gene polymorphism and mood disorders: a preliminary study. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2006;30:1326-29.
59. Wang SS, Davis S, Cerhan JR, Hartge P, Severson RK, Cozen W et al. Polymorphisms in oxidative stress genes and risk for non-Hodgkin lymphoma. Carcinogenesis. 2006;27:1828-34.
60. Stickel F, Osterreicher CH, Datz C, Ferenci P, Wolfel M, Norgauer W et al. Prediction of progression to cirrhosis by a glutathione S-transferase P1 polymorphism in subjects with hereditary hemochromatosis. Arch Intern Med. 2005;165:1835-40.
61. Hartney JM, Stidham T, Goldstrohm DA, Oberley-Deegan RE, Weaver MR, Valnickova-Hansen Z et al. A common polymorphism in extracellular superoxide dismutase affects cardiopulmonary disease risk by altering protein distribution. Circ Cardiovasc Genet. 2014;7:659-66.
62. Sandstrom J, Nilsson P, Karlsson K, Marklund SL. 10-fold increase in human plasma extracellular superoxide dismutase content caused by a mutation in heparin-binding domain. J Biol Chem. 1994;269:19163-66.
63. Arcaroli JJ, Hokanson JE, Abraham E, Geraci M, Murphy JR, Bowler RP et al. Extracellular superoxide dismutase haplotypes are associated with acute lung injury and mortality. Am J Respir Crit Care Med. 2009;179:105-12.
64. Siedlinski M, Van Diemen CC, Postma DS, Vonk JM, Boezen HM. Superoxide dismutases, lung function and bronchial responsiveness in a general population. Eur Respir J. 2009;33:986-92.
65. Juul K, Tybjaerg-Hansen A, Marklund S, Lange P, Nordestgaard BG. Genetically increased antioxidative protection and decreased chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med. 2006;173:858-64.
66. Sorheim IC, Demeo DL, Washko G, Litonjua A, Sparrow D, Bowler R et al. Polymorphisms in the superoxide dismutase-3 gene are associated with emphysema in COPD. COPD. 2010;7:262-68.
67. Naganuma T, Nakayama T, Sato N, Fu Z, Soma M, Aoi N et al. Association of extracellular superoxide dismutase gene with cerebral infarction in women: a haplotype-based case-control study. Hereditas. 2008;145:283-92.
68. Hubackova M, Vaclavikova R, Ehrlichova M, Mrhalova M, Kodet R, Kubackova K et al. Association of superoxide dismutases and NAD(P)H quinone oxidoreductases with prognosis of patients with breast carcinomas. Int J Cancer. 2012;130:338-48.
69. Bauer SR, Richman EL, Sosa E, Weinberg V, Song X, Witte JS et al. Antioxidant and vitamin E transport genes and risk of high-grade prostate cancer and prostate cancer recurrence. Prostate. 2013;73:1786-95.

70. Mohelnikova-Duchonova B, Marsakova L, Vrana D, Holcatova I, Ryska M, Smerhovsky Z et al. Superoxide dismutase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: quinone oxidoreductase polymorphisms and pancreatic cancer risk. Pancreas. 2011;40:72-78.
71. Forsberg L, Lyrenas L, De Faire U, Morgenstern R. A common functional C-T substitution polymorphism in the promoter region of the human catalase gene influences transcription factor binding, reporter gene transcription and is correlated to blood catalase levels. Free Radic Biol Med. 2001b;30:500-5.
72. Nadif R, Mintz M, Jedlicka A, Bertrand JP, Kleeberger SR, Kauffmann F. Association of CAT polymorphisms with catalase activity and exposure to environmental oxidative stimuli. Free Radic Res. 2005;39:1345-50.
73. Christiansen L, Petersen HC, Bathum L, Frederiksen H, McGue M, Christensen K. The catalase -262C/T promoter polymorphism and aging phenotypes. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2004;59:B886-89.
74. Cebrian A, Pharoah PD, Ahmed S, Smith PL, Luccarini C, Luben R et al. Tagging single-nucleotide polymorphisms in antioxidant defense enzymes and susceptibility to breast cancer. Cancer Res. 2006;66:1225-33.
75. Ahn J, Gammon MD, Santella RM, Gaudet MM, Britton JA, Teitelbaum SL et al. Associations between breast cancer risk and the catalase genotype, fruit and vegetable consumption, and supplement use. Am J Epidemiol. 2005;162:943-52.
76. McCullough LE, Santella RM, Cleveland RJ, Bradshaw PT, Millikan RC, North KE et al. Polymorphisms in oxidative stress genes, physical activity, and breast cancer risk. Cancer Causes Control. 2012;23:1949-58.
77. Choi JY, Neuhouser ML, Barnett M, Hudson M, Kristal AR, Thornquist M, King IB, Goodman GE, Ambrosone CB. Polymorphisms in oxidative stress-related genes are not associated with prostate cancer risk in heavy smokers. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2007;16(6):1115-20.
78. Cheng TY, Barnett MJ, Kristal AR, Amberoone CB, King IB, Thornquist MD et al. Genetic variation in myeloperoxidase modifies the association of serum alpha-tocopherol with aggressive prostate cancer among current smokers. J Nutr. 2011;141:1731-37.
79. Funke S, Hoffmeister M, Brenner H, Chang-Claude J. Effect modification by smoking on the association between genetic polymorphisms in oxidative stress genes and colorectal cancer risk. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2009;18:2336-38.
80. Ho JC, Mak JC, Ho SP, Ip MS, Tsang KW, Lam WK et al. Manganese superoxide dismutase and catalase genetic polymorphisms, activity levels, and lung cancer risk in Chinese in Hong Kong. J Thorac Oncol. 2006;1:648-53.
81. Koistinen P, Ruuska S, Saily M, Kakko S, Siitonen P, Siitonen T et al. An association between manganese superoxide dismutase polymorphism and outcome of chemotherapy in acute myeloid leukemia. Haematologica. 2006;91:829-32.
82. Lightfoot TJ, Skibola CF, Smith AG, Forrest MS, Adamson PJ, Morgan GJ et al. Polymorphisms in the oxidative stress genes, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase and risk of non-Hodgkin's lymphoma. Haematologica. 2006;91:1222-27.
83. Chistiakov DA, Zotova EV, Savost'anov KV, Bursa TR, Galeev IV, Strokov IA et al. The 262T>C promoter polymorphism of the cata-lase gene is associated with diabetic neuropathy in type 1 diabetic Russian patients. Diabetes Metab. 2006;32:63-68.
84. Abu-Amero KK, Azad TA, Mousa A, Osman EA, Sultan T, Al-Obeidan SA. A catalase promoter variant rs1001179 is associated with visual acuity but not with primary angle closure glaucoma in Saudi patients. BMC Med Genet, 2013;14:84.
85. Gromadzka G, Kruszynska M, Wierzbicka D, Litwin T, Dziezyc K, Wierzchowska-Ciok A et al. Gene variants encoding proteins involved in antioxidant defense system and the clinical expression of Wilson disease. Liver Int. 2015;35:215-22.
86. Hu YJ, Diamond AM. Role of glutathione peroxidase 1 in breast cancer: loss of heterozygosity and allelic differences in the response to selenium. Cancer Res. 2003;63:3347-51.
87. Hong Z, Tian C, Zhang X. GPX1 gene Pro200Leu polymorphism, erythrocyte GPX activity, and cancer risk. Mol Biol Rep. 2013;40:1801-12.
88. Ye H, Li X, Wang L, Liao Q, Xu L, Huang Y et al. Genetic associations with coronary heart disease: meta-analyses of 12 candidate genetic variants. Gene. 2013;531:71-77.
89. Polonikov AV, Ivanov VP, Bogomazov AD, Freidin MB, Illig T, Solodilova MA. Antioxidant defense enzyme genes and asthma sus-ceptibility: gender-specific effects and heterogeneity in gene-gene interactions between pathogenetic variants of the disease. Biomed Res Int. 2014;708903.
90. Tang TS, Prior SL, Li KW, Ireland HA, Bain SC, Hurel SJ et al. Association between the rs1050450 glutathione peroxidase-1 (C > T) gene variant and peripheral neuropathy in two independent samples of subjects with diabetes mellitus. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2012;22:417-25.
91. Soerensen M, Christensen K, Stevnsner T, Christiansen, L. The Mn-superoxide dismutase single nucleotide polymorphism rs4880 and the glutathione peroxidase 1 single nucleotide polymorphism rs1050450 are associated with aging and longevity in the oldest old. Mech Ageing Dev. 2009;130:308-14.
92. Charniot JC, Sutton A, Bonnefont-Rousselot D, Cosson C, Khani-Bittar R, Giral P et al. Manganese superoxide dismutase dimor-phism relationship with severity and prognosis in cardiogenic shock due to dilated cardiomyopathy. Free Radic Res. 2011;45:379-88.
93. Teranishi M, Uchida Y, Nishio N, Kato K, Otake H, Yoshida T et al. Polymorphisms in genes involved in oxidative stress response in patients with sudden sensorineural hearing loss and Meniere's disease in a Japanese population. DNA Cell Biol. 2012;31:1555-62.
94. Benzie IF. Evolution of dietary antioxidants. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 2003;136:113-26.
95. Alok S, Jain SK, Verma A, Kumar M, Mahor A, Sabharwal M. Herbal antioxidant in clinical practice: a review. Asian Pac J Trop Bio-med. 2014;4:78-84.
96. Bolhassani A, Khavari A, Bathaie SZ. Saffron and natural carotenoids: Biochemical activities and anti-tumor effects. Biochim Biophys Acta. 2014;1845:20-30.
97. Stahl W, Sies H. Antioxidant activity of carotenoids. Mol Aspects Med. 2003;24:345-51.
98. Kaulmann A, Bohn T. Carotenoids, inflammation, and oxidative stress--implications of cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention. Nutr Res. 2014;34:907-29.
99. Olmedilla B, Granado F, Southon S, Wright AJ, Blanco I, Gil-Martinez E et al. Serum concentrations of carotenoids and vitamins A, E, and C in control subjects from five European countries. Br J Nutr. 2001;85:227-38.
100. Leonarduzzi G, Sottero B, Poli G. Targeting tissue oxidative damage by means of cell signaling modulators: the antioxidant concept revisited. Pharmacol Ther. 2010;128:336-74.
101. Palozza P, Colangelo M, Simone R, Catalano A, Boninsegna A, Lanza P et al. Lycopene induces cell growth inhibition by altering

mevalonate pathway and Ras signaling in cancer cell lines. Carcinogenesis. 2010;31:1813-21.
102. Palozza P, Parrone N, Catalano A, Simone R. Tomato lycopene and inflammatory cascade: basic interactions and clinical implications. Curr Med Chem. 2010;17:2547-63.
103. Sarkar FH, Li Y, Wang Z, Kong D. Cellular signaling perturbation by natural products. Cell Signal. 2009;21:1541-47.
104. Woo MS, Jung SH, Kim SY, Hyun JW, Ko KH, Kim WK et al. Curcumin suppresses phorbol ester-induced matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting the PKC to MAPK signaling pathways in human astroglioma cells. Biochem Biophys Res Commun. 2005;335:1017-25.
105. Zingg JM. Modulation of signal transduction by vitamin E. Mol Aspects Med. 2007;28:481-506.
106. Hammarstrom BE, Osterlund C, Lilliehook B, Bucht A. Vitamin E down-modulates mitogen-activated protein kinases, nuclear factor-kappaB and inflammatory responses in lung epithelial cells. Clin Exp Immunol. 2006;147:359-69.
107. Varadharaj S, Steinhour E, Hunter MG, Watkins T, Baran CP, Magalang U et al. Vitamin C-induced activation of phospholipase D in lung microvascular endothelial cells: regulation by MAP kinases. Cell Signal. 2006;18:1396-407.
108. Pearl-Yafe M, Halperin D, Scheuerman O, Fabian I. The p38 pathway partially mediates caspase-3 activation induced by reactive oxygen species in Fanconi anemia C cells. Biochem Pharmacol. 2004;67:539-46.
109. Kyaw M, Yoshizumi M, Tsuchiya K, Kirima K, Suzaki Y, Abe S et al. Antioxidants inhibit endothelin-1 (1-31)-induced proliferation of vascular smooth muscle cells via the inhibition of mitogen-activated protein (MAP) kinase and activator protein-1 (AP-1). Biochem Pharmacol. 2002;64:1521-31.
110. Yeh SL, Wang HM, Chen PY, Wu TC. Interactions of beta-carotene and flavonoids on the secretion of pro-inflammatory mediators in an in vitro system. Chem Biol Interact. 2009;179:386-93.
111. Garg R, Ramchandani AG, Maru GB. Curcumin decreases 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced protein kinase C translocation to modulate downstream targets in mouse skin. Carcinogenesis. 2008;29:1249-57.
112. Chan SS, Monteiro HP, Schindler F, Stern A, Junqueira VBC. Alpha-tocopherol modulates tyrosine phosphorylation in human neutrophils by inhibition of protein kinase C activity and activation of tyrosine phosphatases. Free Radic Res. 2001;35:843-56.
113. Egger T, Hammer A, Wintersperger A, Goti D, Malle E, Sattler W. Modulation of microglial superoxide production by alpha-tocopherol in vitro: attenuation of p67(phox) translocation by a protein phosphatase-dependent pathway. J Neurochem. 2001;79: 1169-82.
114. Han M, Pendem S, Teh SL, Sukumaran DK, Wu F, Wilson JX. Ascorbate protects endothelial barrier function during septic insult: Role of protein phosphatase type 2A. Free Radic Biol Med. 2010;48:128-35.
115. Papparella I, Ceolotto G, Berto L, Cavalli M, Bova S, Cargnelli G et al. Vitamin C prevents zidovudine-induced NAD(P)H oxidase activation and hypertension in the rat. Cardiovasc Res. 2007;73:432-38.
116. Donapaty S, Louis S, Horvath E, Kun J, Sebti SM, Malafa MP. RRR-alpha-Tocopherol succinate down-regulates oncogenic Ras signaling. Mol Cancer Ther. 2006;5:309-16.
117. Lee SH, Lee MY, Han HJ. Short-period hypoxia increases mouse embryonic stem cell proliferation through cooperation of arachidonic acid and PI3K/Akt signalling pathways. Cell Proliferation. 2008;41:17.
118. Roccaro AM, Leleu X, Sacco A, Moreau AS, Hatjiharissi E, Jia X et al. Resveratrol exerts antiproliferative activity and induces apoptosis in Waldenstrom's macroglobulinemia. Clin Cancer Res. 2008;14:1849-58.
119. Kelkel M, Schumacher M, Dicato M, Diederich M. Antioxidant and anti-proliferative properties of lycopene. Free Radic Res. 2011;45:925-40.
120. Armoza A, Haim Y, Bashiri A, Wolak T, Paran E. Tomato extract and the carotenoids lycopene and lutein improve endothelial function and attenuate inflammatory NF-kappaB signaling in endothelial cells. J Hypertens. 2013;31:521-29.
121. Carcamo JM, Pedraza A, Borquez-Ojeda O, Zhang B, Sanchez R, Golde DW. Vitamin C is a kinase inhibitor: dehydroascorbic acid inhibits I kappa B alpha kinase beta. Molecular and Cellular Biology. 2004;24:6645-52.
122. Katavetin P, Miyata T, Inagi R, Tanaka T, Sassa R, Ingelfinger JR et al. High glucose blunts vascular endothelial growth factor response to hypoxia via the oxidative stress-regulated hypoxia-inducible factor/hypoxia-responsible element pathway. J Am Soc Nephrol. 2006;17:1405-13.
123. Zhang B, Tanaka J, Yang L, Yang L, Sakanaka M, Hata R et al. Protective effect of vitamin E against focal brain ischemia and neuronal death through induction of target genes of hypoxia-inducible factor-1. Neuroscience. 2004;126:433-40.
124. Zhu XY, Rodriguez-Porcel M, Bentley MD, Chade AR, Sica V, Napoli C et al. Antioxidant intervention attenuates myocardial neo-vascularization in hypercholesterolemia. Circulation. 2004;109:2109-15.
125. Knowles HJ, Raval RR, Harris AL, Ratcliffe PJ. Effect of ascorbate on the activity of hypoxia-inducible factor in cancer cells. Cancer Res. 2003;63:1764-68.
126. Van Breemen RB, Pajkovic N. Multitargeted therapy of cancer by lycopene. Cancer Lett. 2008;269:339-51.
127. Ben-Dor A, Steiner M, Gheber L, Danilenko M, Dubi N, Linnewiel K et al. Carotenoids activate the antioxidant response element transcription system. Mol Cancer Ther. 2005;4:177-86.
128. Balogun E, Hoque M, Gong P, Killeen E, Green CJ, Foresti R et al. Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. Biochem J. 2003;371:887-95.
129. Talalay P, Fahey JW. Phytochemicals from cruciferous plants protect against cancer by modulating carcinogen metabolism. J Nutr. 2001;131:3027S-33S.
130. Hecht SS. Chemoprevention of cancer by isothiocyanates, modifiers of carcinogen metabolism. J Nutr. 1999;129:768S-774S.
131. Kornbrust DJ, Mavis RD. Relative susceptibility of microsomes from lung, heart, liver, kidney, brain and testes to lipid peroxidation: correlation with vitamin E content. Lipids. 1980;15:315-22.
132. Taylor SL, Lamden MP, Tappel AL. Sensitive fluorometric method for tissue tocopherol analysis. Lipids. 1976;11:530-38.
133. Burton GW, Ingold KU. Beta-carotene: an unusual type of lipid antioxidant. Science. 1984;224:569-73.
134. Di Mascio P, Kaiser S, Sies H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. Arch Biochem Biophys. 1989;274:532-38.
135. Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. Free Radic Biol Med. 2000;28:1456-62.

136. Shi J, Yu J, Pohorly JE, Kakuda Y. Polyphenolics in grape seeds – Biochemistry and functionality. J Med Food. 2003;6:291-99.
137. Ogas T, Kondratyuk TP, Pezzuto JM. Resveratrol analogs: promising chemopreventive agents. Ann NY Acad Sci. 2013;1290: 21-29.
138. Biehler E, Alkerwi A, Hoffmann L, Krause E, Guillaume M, Lair ML et al. Contribution of violaxanthin, neoxanthin, phytoene and phytofluene to total carotenoid intake: Assessment in Luxembourg. Journal of Food Composition and Analysis. 2012;25;56-65.
139. Krinsky NI, Johnson EJ. Carotenoid actions and their relation to health and disease. Mol Aspects Med. 2005;26:459-516.
140. Van Het Hof KH, Brouwer IA, West CE, Haddeman E, Steegers-Theunissen RP, Van Dusseldorp M et al. Bioavailability of lutein from vegetables is 5 times higher than that of beta-carotene. Am J Clin Nutr. 1999;70:261-68.
141. Rock CL, Lovalvo JL, Emenhiser C, Ruffin MT, Flatt SW, Schwartz SJ. Bioavailability of beta-carotene is lower in raw than in pro-cessed carrots and spinach in women. J Nutr. 1998;128:913-16.
142. Bohm F, Edge R, Truscott TG. Interactions of dietary carotenoids with singlet oxygen (1O2) and free radicals: potential effects for human health. Acta Biochim Pol. 2012;59:27-30.
143. El-Agamey A, Lowe GM, McGarvey DJ, Mortensen A, Phillip DM, Truscott TG et al. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. Arch Biochem Biophys. 2004;430:37-48.
144. Palozza P, Krinsky NI. Beta-carotene and alpha-tocopherol are synergistic antioxidants. Arch Biochem Biophys. 1992;297:184-87.
145. Carreau A, El Hafny-Rahbi B, Matejuk A, Grillon C, Kieda C. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial para-meter? Small molecules and hypoxia. J Cell Mol Med. 2011;15:1239-53.
146. Palozza P, Calviello G, Serini S, Maggiano N, Lanza P, Ranelletti FO et al. Beta-carotene at high concentrations induces apoptosis by enhancing oxy-radical production in human adenocarcinoma cells. Free Radic Biol Med. 2001;30:1000-7.
147. Bohm F, Edge R, McGarvey DJ, Truscott TG. Beta-carotene with vitamins E and C offers synergistic cell protection against NOx. FEBS Lett. 1998;436:387-89.
148. Jomova K, Valko M. Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. Eur J Med Chem. 2013;70:102-10.
149. Palozza P, Maggiano N, Calviello G, Lanza P, Piccioni E, Ranelletti FO et al. Canthaxanthin induces apoptosis in human cancer cell lines. Carcinogenesis. 1998;19:373-76.
150. Palozza P. Can beta-carotene regulate cell growth by a redox mechanism? An answer from cultured cells. Biochim Biophys Acta. 2005;1740:215-21.
151. Eichler O, Sies H, Stahl W. Divergent optimum levels of lycopene, beta-carotene and lutein protecting against UVB irradiation in human fibroblastst. Photochem Photobiol. 2002;75:503-6.
152. Grune T, Lietz G, Palou A, Eros AC, Stahl W, Tang G et al. Beta-carotene is an important vitamin A source for humans. J Nutr. 2010;140:2268S-2285S.
153. Ho CC, De Moura FF, Kim SH, Clifford AJ. Excentral cleavage of beta-carotene in vivo in a healthy man. Am J Clin Nutr. 2007;85:770-77.
154. Alija AJ, Bresgen N, Sommerburg O, Langhans CD, Siems W, Eckl PM. Cyto- and genotoxic potential of beta-carotene and cleavage products under oxidative stress. Biofactors. 2005;24:159-63.
155. Siems W, Wiswedel I, Salerno C, Crifo C, Augustin W, Schild L et al. Beta-carotene breakdown products may impair mitochondrial functions – potential side effects of high-dose beta-carotene supplementation. J Nutr Biochem. 2005;16:385-97.
156. Marques SA, Loureiro AP, Gomes OF, Garcia CC, Di Mascio P, Medeiero MH. Induction of 1,N(2)-etheno-2'-deoxyguanosine in DNA exposed to beta-carotene oxidation products. FEBS Lett. 2004;560:125-30.
157. Murata M, Kawanishi S. Oxidative DNA damage by vitamin A and its derivative via superoxide generation. J Biol Chem. 2000;275:2003-8.
158. Ascenso A, Ribeiro H, Marques HC, Oliveira H, Santos C, Simoes S. Chemoprevention of photocarcinogenesis by lycopene. Exp Dermatol. 2014;23:874-78.
159. Chinembiri TN, Du Plessis LH, Gerber M, Hamman JH, Du Plessis J. Review of natural compounds for potential skin cancer trea-tment. Molecules. 2014;19:11679-721.
160. Palozza P, Calviello G, Serini S, Moscato P, Luberto C, Bartoli GM. Antitumor effect of an oral administration of canthaxanthin on BALB/c mice bearing thymoma cells. Nutr Cancer. 1997;28:199-205.
161. Palozza P. Prooxidant actions of carotenoids in biologic systems. Nutr Rev. 1998;56:257-65.
162. Muto Y, Fujii J, Shidoji Y, Moriwaki H, Kawaguchi T, Noda T. Growth retardation in human cervical dysplasia-derived cell lines by beta-carotene through down-regulation of epidermal growth factor receptor. Am J Clin Nutr. 1995;62:1535S-1540S.
163. Mathews-Roth MM. Carotenoids and photoprotection. Photochemistry and Photobiology. 1997;65:4.
164. Fernandez-García E. Skin protection against UV light by dietary antioxidants. Food Funct. 2014;5:1994-2003.
165. Kopcke W, Krutmann J. Protection from sunburn with beta-Carotene: a meta-analysis. Photochem Photobiol. 2008;84:284-88.
166. Stahl W, Heinrich U, Aust O, Tronnier H, Sies H. Lycopene-rich products and dietary photoprotection. Photochem Photobiol Sci. 2006;5:238-42.
167. Stahl W, Heinrich U, Wiseman S, Eichler O, Sies H, Tronnier H. Dietary tomato paste protects against ultraviolet light-induced erythema in humans. J Nutr. 2001;131:1449-51.
168. Biesalski HK, Obermueller-Jevic UC. UV light, beta-carotene and human skin--beneficial and potentially harmful effects. Arch Biochem Biophys. 2001;389:1-6.
169. Weikel KA, Garber C, Baburins A, Taylor A. Nutritional modulation of cataract. Nutr Rev. 2014;72:30-47.
170. Koushan K, Rusovici R, Li W, Ferguson LR, Chalam KV. The role of lutein in eye-related disease. Nutrients. 2013;5:1823-39.
171. Landrum JT, Bone RA. Lutein, zeaxanthin, and the macular pigment. Arch Biochem Biophys. 2001;385:28-40.
172. Das BC, Thapa P, Karki R, Das S, Mahapatra S, Liu TC et al. Retinoic acid signaling pathways in development and diseases. Bioorg Med Chem. 2014;22:673-83.
173. Wei LN. Retinoid receptors and their coregulators. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2003;43:47-72.
174. Lee LK, Foo KY. An appraisal of the therapeutic value of lycopene for the chemoprevention of prostate cancer: A nutrigenomic approach. Food Research International. 2013;54:1217-28.
175. Salmeen A, Barford D. Functions and mechanisms of redox regulation of cysteine-based phosphatases. Antioxid Redox Signal. 2005;7:560-77.
176. Chiu J, Dawes IW. Redox control of cell proliferation. Trends Cell Biol. 2012;22:592-601.
177. De Berardinis V, Vallenet D, Castelli V, Besnard M, Pinet A, Cruaud C et al. A complete collection of single-gene deletion mutants of Acinetobacter baylyi ADP1. Mol Syst Biol. 2008;4:174.

178. Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. Cancer Cell. 2008;13:472-82.
179. Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007;8:49-62.
180. Tanaka H, Arakawa H, Yamaguchi T, Shiraishi K, Fukuda S, Matsui K. A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. Nature. 2001;404:42-49.
181. Cairns RA, Harris I, McCracken S, Mak TW. Cancer cell metabolism. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2011;76:299-311.
182. Serra-Perez A, Planas AM, Nunez-O'Mara A, Berra E, Garcia-Villoria J, Ribes A et al. Extended ischemia prevents HIF1alpha de-gradation at reoxygenation by impairing prolyl-hydroxylation: role of Krebs cycle metabolites. J Biol Chem. 2010;285:18217-24.
183. Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, Boulahbel H, Watson DG, Mansfield KD et al. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-alpha prolyl hydroxylase. Cancer Cell. 2005;7:77-85.
184. Choi SW, Friso S. Epigenetics: a new bridge between nutrition and health. Adv Nutr. 2010;1:8-16.
185. Qin W, Zhu W, Shi H, Hewett JE, Ruhlen RL, MacDonald RS et al. Soy isoflavones have an antiestrogenic effect and alter mammary promoter hypermethylation in healthy premenopausal women. Nutr Cancer. 2009;61:238-44.
186. Weiss FU, Marques IJ, Woltering JM, Vlecken DH, Aghdassi A, Partecke LI et al. Retinoic acid receptor antagonists inhibit miR-10a expression and block metastatic behavior of pancreatic cancer. Gastroenterology. 2009;137:2136-45.
187. Yang J, Cao Y, Sun J, Zhang Y. Curcumin reduces the expression of Bcl-2 by upregulating miR-15a and miR-16 in MCF-7 cells. Med Oncol. 2009;27:1114-18.
188. Sun M, Estrov Z, Ji Y, Coombes KR, Harris DH, Kurzrock R. Curcumin (diferuloylmethane) alters the expression profiles of microRNAs in human pancreatic cancer cells. Mol Cancer Ther. 2008;7:464-73.
189. Fang M, Chen D, Yang CS. Dietary polyphenols may affect DNA methylation. J Nutr. 2007;137:223s-228s.

Imprinting e programação metabólica | 30

Luiza Nicolisi Guido
Francisco Bolaños-Jimenez
Thomas Prates Ong

INTRODUÇÃO

Doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) relacionadas a alterações metabólicas, como obesidade, diabete tipo 2 e doenças cardiovasculares, constituem um grave problema de saúde pública, responsável pela maioria das mortes e alto impacto financeiro em todo o mundo.[1] Em razão dos elevados esforços e gastos para definição de tratamentos mais eficazes, torna-se necessário o estabelecimento de estratégias para a identificação de fatores de risco, com o objetivo de diminuir a incidência e o número de óbitos causados por essas doenças.

No início da década de 1990, um estudo publicado por Hales e Barker[2] introduziu um conceito inovador que desafiava a visão corrente a respeito da etiologia das doenças metabólicas, e de acordo com o qual diferentes alterações associadas à síndrome metabólica teriam origem já no início da vida, ainda no período intrauterino.[2-4] Mais especificamente, observou-se, em uma população de Hertfordshire (Reino Unido), relação entre o baixo peso ao nascer e maior suscetibilidade ao desenvolvimento de síndrome metabólica na vida adulta,[5] caracterizada por hipertensão, concentrações plasmáticas elevadas de triacilgliceróis, resistência à ação da insulina, intolerância à glicose e diabete melito tipo 2 (DM2).[6]

O período de desenvolvimento embrionário caracteriza-se por grande plasticidade, o que o torna janela de sensibilidade especial em que o feto se encontra mais suscetível às alterações que ocorrem no ambiente intrauterino.[7] Nesse sentido, entre os diferentes fatores que afetam as condições do ambiente intrauterino, destaca-se a nutrição materna, que é capaz de causar alterações permanentes na fisiologia e função dos tecidos do feto com consequências importantes à saúde na idade adulta.[8] Esse fenômeno é denominado programação metabólica.[9]

Nesse contexto, dois períodos históricos são de extrema importância para entender os efeitos da nutrição materna na programação metabólica. O primeiro deles ficou conhecido como o "inverno da fome" ou "fome holandesa", que ocorreu entre novembro de 1944 e maio de 1945. Foi consequência de embargo de alimentos imposto pela Alemanha à parte ocidental da Holanda.[10] Durante esse tempo de privação alimentar, muitas holandesas encontravam-se em diferentes períodos gestacionais. Seus filhos foram acompanhados nas décadas do pós-guerra e integram coorte importante cujos dados mostram que, na idade adulta, apresentaram: maior risco de se tornarem obesos, concentrações plasmáticas de glicose mais elevadas, resistência à ação da insulina e maior suscetibilidade ao diabete tipo 2 e às doenças cardiovasculares.[11] De forma interessante, a subnutrição materna nos primeiros meses de gestação foi relacionada às alterações no metabolismo de lipídios, enquanto a subnutrição nos últimos meses de gestação causou distúrbios no metabolismo da insulina e glicose.[4,11] Esses resultados indicam que o período gestacional no qual a mãe se encontrava quando exposta à subnutrição teve grande influência no fenótipo metabólico dos filhos.

Outro período importante nesse contexto foi o "Cerco a Leningrado", que perdurou por um período mais longo que a fome holandesa, entre os anos de 1941 e 1944. Nessa época, a cidade Leningrado (atualmente São Petersburgo, Rússia) foi cercada e isolada pelos alemães, e ali ficaram aprisionadas aproximadamente três milhões de pessoas, das quais aproximadamente 800 mil morreram de fome.[12] Entretanto, nessa população, não se observou aumento de casos de síndrome metabólica em indivíduos expostos à privação alimentar intensa no período intrauterino. Acredita-se que essa diferença se dê pelo fato de a população de Leningrado já apresentar um quadro de subnutrição quando o cerco foi estabelecido. Todavia,

esses dois períodos, quando comparados, reforçam a importância do momento de exposição à privação alimentar e as condições iniciais a que essas populações eram expostas na programação dos fenótipos na idade adulta.[11,13]

Com base nos resultados desses estudos epidemiológicos, estabeleceu-se a hipótese do fenótipo econômico (*the thrifty phenotype hypothesis*),[2] segundo a qual a subnutrição no período embrionário causaria adaptações no metabolismo do feto que permitiriam a sua sobrevivência em um ambiente de privação alimentar. No entanto, quando existe incompatibilidade de ambientes e esse indivíduo é exposto a condições adequadas ou de excesso de alimentos após o nascimento, essas adaptações falham, em razão da demanda metabólica excessiva, que pode levar ao desenvolvimento de obesidade, diabete tipo 2 ou doenças cardiovasculares na vida adulta.[14] Da mesma forma que a subnutrição materna, estudos recentes têm demonstrado que a obesidade materna e o diabete gestacional também são capazes de programar alterações associadas à síndrome metabólica nos descendentes, como maior adiposidade.[15] Além disso, estudos mais recentes apontam que a nutrição paterna também apresenta grandes impactos na vida de seus descendentes, sendo a programação que favorece o surgimento da síndrome metabólica um dos efeitos observados.[16]

Embora esses estudos epidemiológicos tenham sido de extrema importância na observação dos efeitos da nutrição parental na saúde de seus descendentes, várias questões ainda precisam ser elucidadas e incluem: como e quais exposições ambientais específicas têm a capacidade de alterar permanentemente a fisiologia e o metabolismo de um indivíduo? Quais os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na programação metabólica? Além disso, como ocorre a transmissão dessas informações para a próxima geração? Recentemente, estudos epidemiológicos e clínicos, bem como em modelos experimentais com animais, possibilitaram elucidar parte dos mecanismos moleculares envolvidos na programação de doenças metabólicas. De particular interesse, destacam-se os mecanismos epigenéticos, responsáveis por controle da expressão gênica, proliferação e diferenciação celular, silenciamento do segundo cromossomo X feminino e *imprinting* genômico, e que apresentam grande impacto no desenvolvimento embrionário.[9,17,18]

EPIGENÉTICA E *IMPRINTING*

Epigenética

O termo epigenética refere-se a alterações que ocorrem no DNA que não correspondem a variações na sua sequência original, mas que têm a capacidade de controlar a compactação da cromatina e a expressão gênica. Essas alterações são herdáveis, o que significa que elas permanecem após os processos de mitose e meiose.[19] Mecanismos epigenéticos apresentam grande importância no desenvolvimento embrionário, sendo essenciais para processos como diferenciação e proliferação celular, silenciamento do cromossomo X e *imprinting* genômico. Dentre os mecanismos epigenéticos conhecidos na literatura, destacam-se a metilação do DNA e as alterações pós-traducionais em histonas,[20] descritos em detalhes no Capítulo 5.

A metilação do DNA refere-se à adição covalente de um grupamento metil (CH_3) no carbono 5 de uma base citosina do DNA, que precede uma guanina, originando uma 5-metilcitosina. A metilação do DNA costuma ocorrer em regiões ricas em dinucleotídeos CG, as chamadas "ilhas CpG". Essas regiões normalmente se localizam na região promotora dos genes, a qual controla a ativação da transcrição.[18] Dessa forma, uma região promotora do DNA hipermetilada corresponde ao silenciamento, enquanto a hipometilada está relacionada à ativação gênica. Aproximadamente 70% das ilhas CpG encontram-se metiladas, especialmente sequências repetitivas e retrotransposons (sequências de DNA que possuem a habilidade de se mover de um lugar para outro do cromossomo).[21] A metilação do DNA é induzida e mantida por meio da atividade das enzimas DNA metil transferases (DNMT). A DNMT1 é a isoforma da enzima responsável pela manutenção do padrão de metilação do DNA entre os ciclos de replicação celular e garante que as células "filhas" tenham o mesmo padrão de metilação das células que as originaram. A DNMT1o é expressa principalmente em oócitos e no embrião, está ausente em tecidos adultos e nos espermatozoides e apresenta grande importância na manutenção do padrão de metilação de genes imprintados.[19] Já a DNMT1s está presente também nos oócitos, espermatozoides e em todos os tecidos adultos. As enzimas DNMT3a e DNMT3b estão relacionadas à metilação *de novo*. Sua expressão é ausente nos estágios de 2 a 8 das células no período embrionário, e é reestabelecida nos estágios de mórula e gástrula.[22]

Por ser uma molécula muito longa, o DNA encontra-se "empacotado" no núcleo das células, na forma de cromatina, a qual é composta de subunidades chamadas de nucleossomos, que correspondem ao DNA envolto ao redor de um octâmero de histonas. As alterações pós-traducionais em histonas se referem a marcas adicionadas às caudas N-terminais dessas proteínas, que têm a capacidade de alterar estrutura e conformação da cromatina. Dentre as modificações mais conhecidas, destacam-se a metilação e a acetilação de resíduos de aminoácidos. A metilação das caudas N-terminais de histonas é mediada pela enzima histona metiltransferase (HMT), que adiciona grupamentos metil a essas proteínas. O controle da

acetilação de histonas é mediado pelas enzimas histona acetiltransferases (HAT) e histona desacetilases (HDAC), que adicionam e removem grupamentos acetil dessas proteínas, respectivamente. A ativação ou repressão transcricional dependerá da histona, do resíduo de aminoácido alterado e do tipo de modificação.[18]

Sabe-se que pode haver interação entre a metilação do DNA e as alterações pós-traducionais em histonas na regulação da estrutura da cromatina. Nesse sentido, proteínas como a *methyl Cpg binding protein 2* (MeCP-2) e as *methyl CpG binding domain 1-3* (MBD 1-3) se ligam a sequências metiladas do DNA e são responsáveis por recrutar enzimas modificadoras de histonas e outras proteínas, como as do complexo *Polycomb*, que induzem a compactação da cromatina (estado de heterocromatina) e o consequente silenciamento gênico (Figura 30.1).[23,24]

Epigenética e sua importância no desenvolvimento: *imprinting*

Os padrões de metilação do DNA e as modificações pós-traducionais em histonas de um indivíduo são estabelecidos logo no início da vida, ainda no período embrionário. Dentre os mecanismos controlados pela maquinaria epigenética, encontra-se o *imprinting* genômico, essencial para o desenvolvimento normal do feto. Nas células diploides, a maioria dos genes apresenta duas cópias, sendo um alelo herdado da mãe e outro do pai. Normalmente, ambos se comportam da mesma forma, ativos ou silenciados. Entretanto, no caso dos genes imprintados, esses alelos se comportam de forma diferente: um alelo apresenta-se ativo e o outro, silenciado.[25] Uma das teorias criadas para explicar esse fenômeno, a "teoria do parentesco", sugere que exista um "conflito de interesses" entre o genoma paterno e o materno. Nesse sentido, os genes paternos promoveriam o crescimento do feto, garantindo o máximo aproveitamento dos recursos oferecidos pela mãe, a fim de gerar descendentes com maiores chances de sobrevivência. Por outro lado, os genes maternos desacelerariam esse processo para manter reservas energéticas durante a gestação e para garantir sua capacidade de conduzir próximas gestações. Outra teoria, a da "coadaptação", aponta que os genomas paterno e materno trabalhariam em conjunto, a fim de balancear o crescimento adequado do feto e garantir o bem-estar materno.[26]

Genes imprintados são classificados em três categorias: genes que controlam a alocação de recursos maternos ao feto; genes que regulam o metabolismo no período pós-natal e genes que determinam, já no período fetal, o metabolismo de órgãos em desenvolvimento (como pâncreas, músculos, adipócitos e hipotálamo).[27,28] Esses genes são amplamente ativos no período embrionário e também desempenham papel relevante após o nascimento, essenciais para a sobrevivência de neonatos e relacionados à alimentação, à manutenção da temperatura corporal e ao metabolismo, assim como em relação ao comportamento pós-nascimento. Além disso, evidências sugerem que genes imprintados também estejam relacionados à manutenção e à renovação de células-tronco.[26]

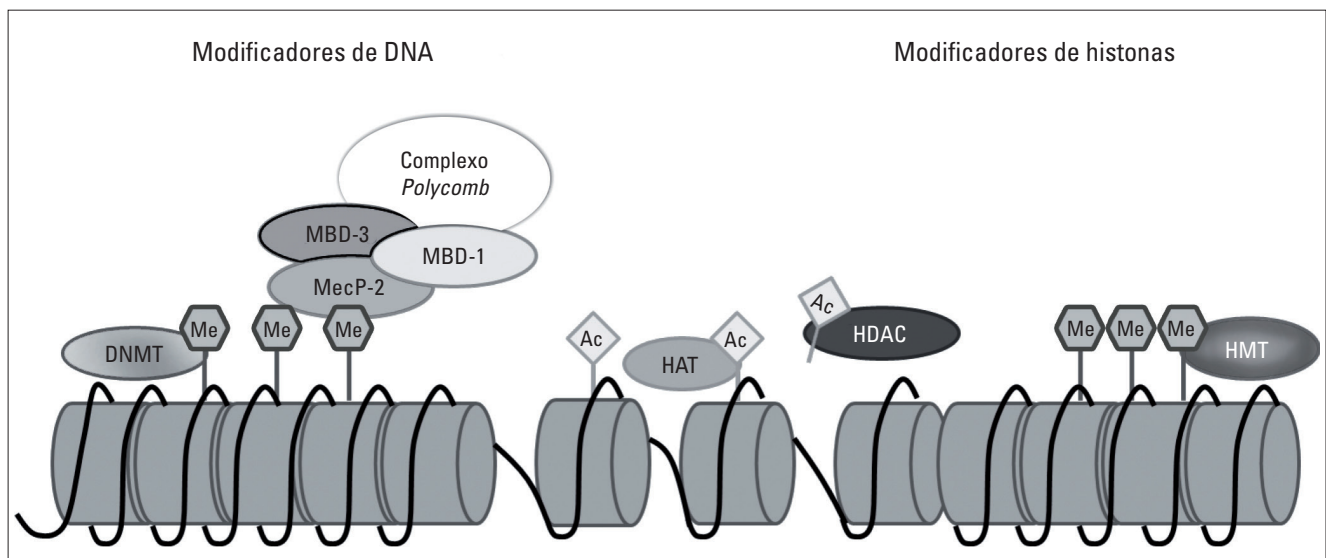



Figura 30.1 Representação de mecanismos epigenéticos envolvidos na conformação e na compactação da cromatina. A adição de grupamento metil CH_3 por meio das enzimas DNA metiltransferases (DNMT) na molécula de DNA está envolvida no silenciamento gênico e é responsável por recrutar proteínas que se ligam ao DNA metilado (MBD 1 e 3 e MecP-2) e proteínas como as do compexo *Polycomb*, responsáveis por alterações pós-traducionais de histonas relacionadas à compactação da cromatina e ao silenciamento gênico. A adição de grupamentos químicos como metil e acetil em histonas por meio das enzimas histona metiltransferases (HMT), histona acetiltransferases (HAT) e histona desacetilases (HDAC) também apresenta papel importante na conformação da cromatina. Ac: acetil; Me: metil.

Genes imprintados não ocorrem ao acaso no genoma e aproximadamente 80% deles se apresentam em conjuntos. Pelo menos 13 conjuntos já foram observados em oito cromossomos, contendo entre 2 e 15 genes. Sugere-se que seu controle ocorra no âmbito de cromossomo/conjunto e não no de gene isolado.[29] Esses conjuntos apresentam uma região de controle de *imprinting* (ICR, *imprinting control region*) com elemento atuante em *cis*. A deleção de uma ICR implicaria a perda de *imprinting*, acarretando expressão ou silenciamento bialélico de todos os genes de um conjunto. Esses elementos são caracterizados por apresentar diferentes padrões de marcas epigenéticas (metilação de DNA e modificações em histonas), que regulam a expressão gênica.[30]

Logo após a identificação dos primeiros genes imprintados, observou-se que os alelos parentais em *loci* imprintados apresentavam padrões diferentes de metilação de DNA, regiões que são denominadas "diferencialmente metiladas" (DMR, *differentially methylated regions*), caracterizadas pela metilação de apenas um alelo parental.[31] A metilação das ICR no genoma materno ocorre, principalmente, em promotores de genes, enquanto a metilação das ICR no genoma paterno ocorre em regiões intergênicas (Figura 30.2). Contudo, ainda é desconhecido como essa diferença de localização de metilação dos genomas materno e paterno é determinada pelo organismo.[29]

Mecanismos epigenéticos podem regular a magnitude do *imprinting* gênico por atender a quatro critérios essenciais: as marcas presentes no alelo devem ser capazes de influenciar a transcrição gênica; devem ser herdáveis, de forma que essas informações sejam totalmente propagadas para as células filhas durante a divisão celular; a marca deve ser adicionada ao alelo em um momento em que os genomas materno/paterno encontram-se em compartimentos diferentes, ou seja, durante a gametogênese ou logo após a fertilização; e essas marcas devem ser reversíveis, de modo que haja um mecanismo que as apague durante a formação das células germinativas primordiais do feto.[32]

Em mamíferos, logo após a fertilização, o zigoto passa por um processo de reprogramação do seu epigenoma. O genoma paterno é parcialmente desmetilado poucas horas após a fertilização por meio de desmetilação ativa, pela atividade da enzima Tet3, que elimina grupos CH_3 da 5-metil-citosina. Esse evento é seguido de uma desmetilação mais lenta do genoma materno, durante as etapas subsequentes de divisão mitótica.[33,34] Acredita-se que esse processo ocorra pela perda de atividade da enzima DNMT1, responsável pela metilação de manutenção no DNA. Dessa forma, após as primeiras divisões celulares, o padrão de metilação materno do DNA é perdido. O objetivo desse processo é a formação de células pluripotentes no feto, nas quais todos os genes são potencialmente passíveis de sofrer ativação transcricional. Simultaneamente a esse evento, ocorrem remodelação da cromatina e alterações dinâmicas nas marcas em histonas.[31] Entre a formação e a implementação do blastocisto da gástrula, o geno-

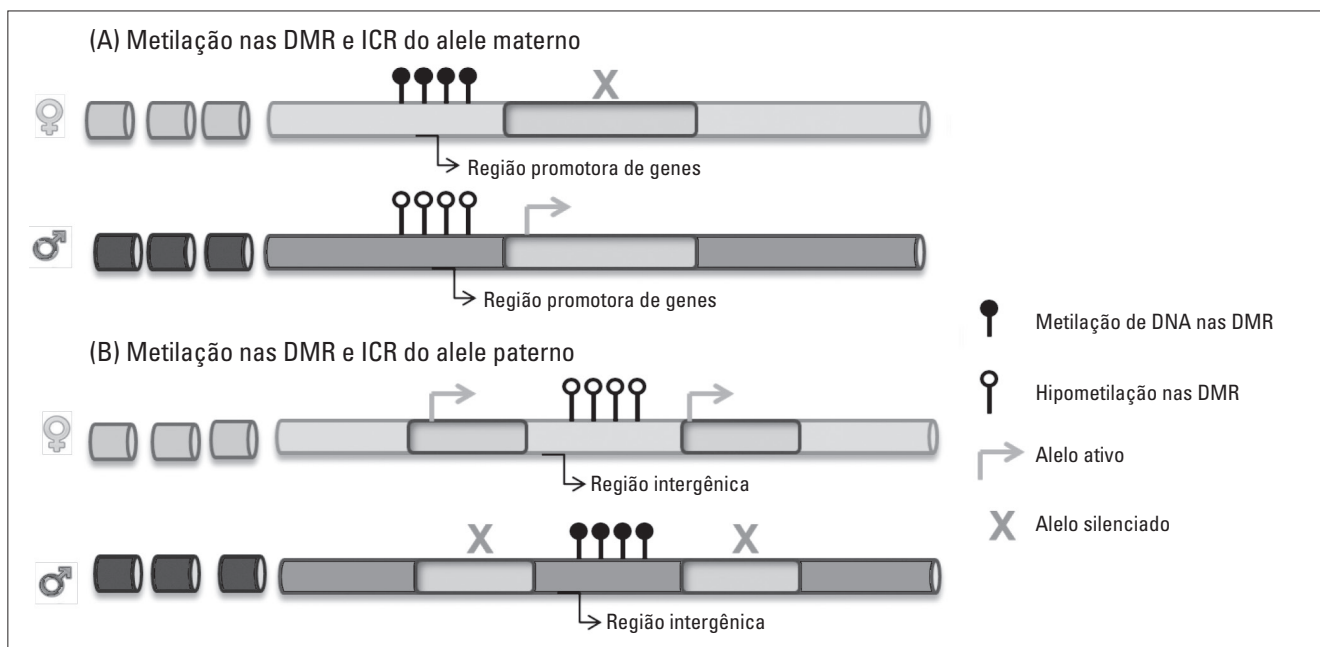



Figura 30.2 Representação esquemática das regiões diferentemente metiladas (DMR) nas regiões de controle de *imprinting* (ICR) nos genomas materno e paterno. Em genes imprintados, a hipermetilação da região promotora dos genes maternos (A) leva ao silenciamento desse alelo, enquanto no genoma paterno (B) a metilação das ICR ocorre nas regiões intergênicas. A hipermetilação do DNA está relacionada ao silenciamento do alelo imprintado, enquanto a hipometilação é responsável pela ativação da transcrição gênica. **Fonte:** adaptada de Ferguson-Smith.[31]

ma do embrião passa por um processo de metilação *de novo*, quando novos padrões epigenéticos são estabelecidos. Nessa etapa, as enzimas DNMT3a e 3b apresentam atividade aumentada.[35]

Mesmo sendo submetidos a ondas de desmetilação global e a metilação *de novo*, os genes imprintados são, de alguma forma, resistentes a esse processo em células somáticas, mantendo o seu padrão de marcas epigenéticas (Figura 30.3).

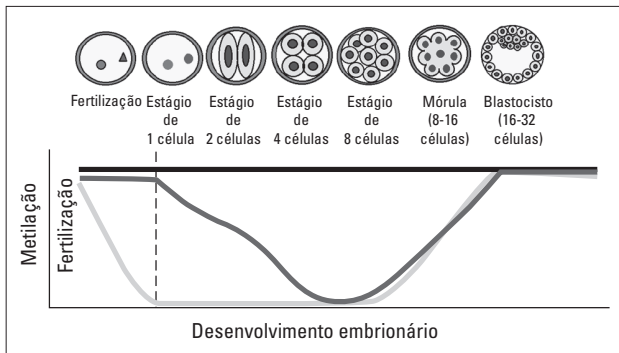



Figura 30.3 Representação da reprogramação epigenética durante o desenvolvimento embrionário. Logo após a fertilização, o genoma paterno (curva cinza-claro) sofre desmetilação ativa, seguida de desmetilação passiva do genoma materno (curva cinza-escuro). A partir do estágio de mórula (8-16 células), os padrões de metilação de DNA são reestabelecidos no embrião. Nesse processo, os genes imprintados não são afetados (curva preta). **Fonte:** adaptada de Weaver e Bartolomei.[36]

Entretanto, nas células germinativas primordiais masculinas e femininas, formadas no período embrionário, as marcas epigenéticas em genes imprintados são apagadas, por meio da perda de metilação das ICR,[32] garantindo que um cromossomo paterno não apresente padrão de metilação materno e que um cromossomo materno não apresente padrão de *imprinting* paterno. As células germinativas produzidas subsequentemente adquirem um novo padrão epigenético, enquanto migram para a gônada em formação. Essa reprogramação inclui o estabelecimento de metilação de DNA gênero-específica nas ICR. No gênero masculino, essa reprogramação epigenética ocorre durante o desenvolvimento fetal, enquanto no gênero feminino esse processo ocorre após o nascimento, durante a fase de desenvolvimento do oócito (Figura 30.4).[37]

A metilação *de novo* que ocorre nas DMR das células germinativas tem como alvo *loci* imprintados específicos e em diferentes regiões nos gêneros masculino e feminino. Para isso, esse processo deve ocorrer em locais corretos. A enzima DNMT3L atua como um cofator que estimula a metilação *de novo* pela DMNT3a e 3b e é essencial para a metilação em genes imprintados nos gametas.[36] O estabelecimento do *imprinting* genético não acontece de forma aleatória, mas em regiões específicas do genoma, com destaque para genes que codificam as proteínas Zfp57 e PGC7/Stella, que seriam responsáveis por sinalizar as regiões corretas de *imprinting*. Além disso, elas apresentam atividade importante na proteção do genoma contra as ondas de desmetilação e na manutenção do *imprinting* materno e paterno.[38,39]

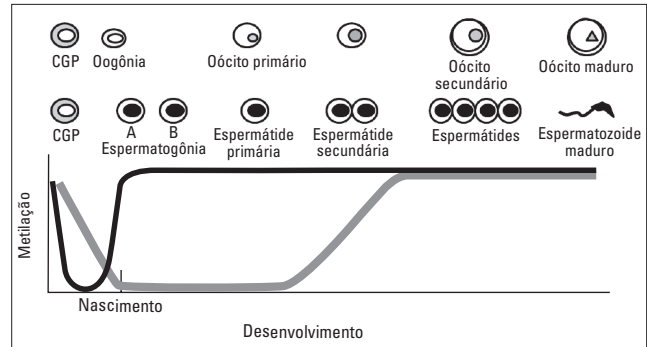



Figura 30.4 Representação da reprogramação epigenética em genes imprintados que ocorre nas células germinativas primordiais (CGP) até o desenvolvimento das células germinativas maduras. A reprogramação do epigenoma nos espermatozoides ocorre no período embrionário (curva preta), enquanto no oócito ocorre após o nascimento até a formação do oócito maduro (curva cinza). **Fonte:** adaptada de Weaver e Bartolomei.[36]

Defeitos nos mecanismos de *imprinting* e suas implicações

Como todo processo biológico, o estabelecimento, a reprogramação e a manutenção do *imprinting* podem apresentar certa taxa de erro, a qual pode acarretar um cromossomo paterno carregando um *imprinting* materno ou um cromossomo materno carregando um *imprinting* paterno. Não se sabe ao certo se esse tipo de erro pode ser reparado após a fertilização e, dessa forma, erros de *imprinting* permanecerão em todas as células somáticas derivadas de células com defeitos no *imprinting* genômico. Esses defeitos podem causar a ativação de um alelo que deveria estar silenciado ou o silenciamento de um alelo que deveria estar ativo. Assim, ocorre expressão ou silenciamento bialélico do gene em questão.[30]

Visto que os genes imprintados apresentam papel essencial no crescimento e que sua expressão é de extrema importância, defeitos nesse mecanismo podem levar ao desenvolvimento de síndromes como as de Prader-Willi, Angelman, Beckwith-Wiedemann e Silver-Russell.[36] Além disso, considerando que genes imprintados têm papel relevante no desenvolvimento do organismo, evidências recentes apontam que mecanismos defeituosos de *imprinting* no início da vida podem estar relacionados ao desenvolvimento de DCNT na vida adulta, como síndrome metabólica, diabete tipo 2, doenças cardiovasculares, distúrbios psiquiátricos e câncer (Figura 30.5).

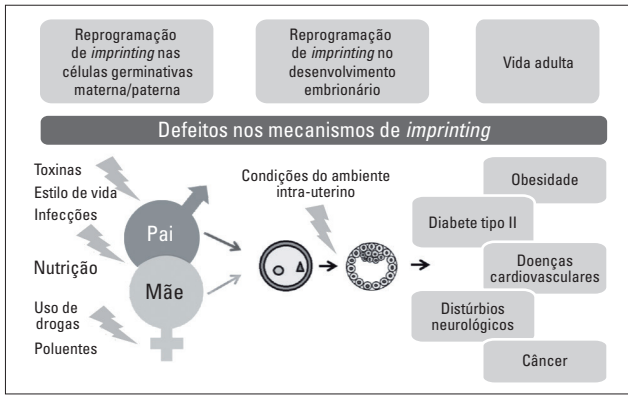



Figura 30.5 Representação esquemática da influência do ambiente nos mecanismos de *imprinting*. Fatores ambientais, como exposição a poluentes e toxinas, infecções, estilo de vida e nutrição, podem interferir em mecanismos epigenéticos responsáveis pelo *imprinting* genômico, tanto nas células germinativas quanto no desenvolvimento embrionário. **Fonte:** adaptada de Lambertini;[25] Horsthemke.[30,40,41]

Os defeitos de *imprinting* ocorrem como resultado de mutações epigenéticas e se referem a padrões anormais de metilação de DNA e de modificações em histonas. A mutação epigenética primária refere-se a alterações que ocorrem na ausência de mutações no DNA, enquanto as secundárias são consequências diretas de mutações no DNA.[41] Evidências recentes apontam que a maioria dos defeitos em *imprinting* é causada por mutações epigenéticas primárias, enquanto as secundárias são mais raras. Por exemplo, apenas 10% dos pacientes com síndrome de Prader–Willi ou de Angelman apresentam mutações epigenéticas secundárias. Além disso, o *imprinting* genômico é lido por meio de proteínas, como a proteína MeCP2, que se liga ao DNA e à cromatina e está envolvida no silenciamento ou na ativação de um alelo. Mutações que afetam a atividade dessas proteínas podem resultar em alteração da expressão gênica, mesmo que os padrões de *imprinting* tenham sido bem estabelecidos e mantidos, também contribuindo para o desenvolvimento de doenças.[30]

Mecanismos que modulam eventos epigenéticos, incluindo *imprinting*

O *imprinting* genômico é um processo complexo ligado aos mecanismos epigenéticos que respondem a estímulos ambientais de diversas origens e podem ser considerados biomarcadores de detecção de alterações no desenvolvimento embrionário.[25] Esse conceito foi reforçado por estudos epidemiológicos e moleculares que avaliaram como a nutrição e o estresse psicossocial materno, durante a gestação em períodos de guerra, afetam o padrão de *imprinting* no embrião. A privação alimentar durante o período fetal vivenciada na fome holandesa, por exemplo, foi correlacionada com alterações no padrão de metilação de genes imprintados na progênie, como *INS, IGF2, GNASAS* e *MEG3*. Essas alterações ainda podiam ser rastreadas após 60 anos do ocorrido.[42] Nesse contexto, as influências ambientais relacionadas à nutrição parental no período de fome estariam mais ligadas à disfunção de *imprinting* relacionadas ao metabolismo na progênie, enquanto o impacto psicossocial sofrido nesse período teria relação com os distúrbios neurológicos e comportamentais nos descendentes.[43] Além de privação alimentar e estresse psicossocial, outros estímulos ambientais também podem estar envolvidos na desregulação de mecanismos de *imprinting*, como obesidade, infecções e exposição a concentrações elevadas de glicocorticoides e toxinas.[40]

A programação de doenças na vida adulta pode estar relacionada às alterações no desenvolvimento ideal do embrião. Evidências recentes apontam que o desenvolvimento de condições clínicas e DCNT – como obesidade, diabete tipo 2, distúrbios psiquiátricos e câncer – estaria relacionado à desregulação nos mecanismos de *imprinting*. Essa desregulação pode causar alterações permanentes na estrutura e na fisiologia dos órgãos do feto, como alteração na atividade de enzimas e vias metabólicas e em vias do metabolismo, no número de néfrons ou de cardiomiócitos ou na velocidade de proliferação celular, com maior risco de transformação maligna. A janela de exposição na qual ocorre a alteração é de extrema importância para determinar os efeitos na progênie, uma vez que órgãos e sistemas distintos se diferenciam em etapas determinadas do desenvolvimento embrionário.[44]

Durante o desenvolvimento embrionário, o indivíduo apresenta maior plasticidade fenotípica, que se caracteriza pela capacidade de um mesmo genótipo dar origem a diferentes fenótipos (estruturas, estado fisiológico e comportamental), dependendo dos estímulos que ocorrem no ambiente de exposição. Nesse caso, as alterações que ocorrem no ambiente intrauterino têm a capacidade de alterar os processos biológicos e fisiológicos no feto, que podem se perpetuar na vida adulta. A janela de exposição na qual ocorre "insultos" é de extrema importância para determinar os efeitos na progênie, uma vez que órgãos e sistemas distintos se diferenciam em etapas determinadas do desenvolvimento embrionário. Do ponto de vista epigenético, é durante essa etapa que o epigenoma encontra-se mais "plástico" e suscetível a "insultos" promovidos por ambiente adverso. Em ratos, por exemplo, a privação de nutrientes no início do desenvolvimento embrionário resulta em efeitos permanentes no crescimento desses animais, enquanto a privação alimentar mais tardia ocasiona efeitos passageiros.[45]

Imprinting e programação de doenças metabólicas e cardiovasculares

Evidências recentes apontam genes imprintados como reguladores essenciais do metabolismo de mamíferos desde a infância até a vida adulta. Padrões anormais de

expressão de genes imprintados maternos ou paternos podem afetar o peso corporal e o metabolismo em adultos, atuando em múltiplos tecidos e vias metabólicas. Como resultado, o indivíduo pode desenvolver obesidade e diabete tipo 2, mesmo na ausência de hiperfagia.

No estudo epidemiológico *Newborn Epigenetics Study* (Nest), observou-se que crianças com sobrepeso ou obesidade apresentaram, em relação a crianças não obesas, hipermetilação nas DMR do gene imprintado *H19*, localizada em uma ICR do gene *IGF2*. A maior diferença foi observada entre indivíduos que não foram amamentados após o nascimento, em relação aos que foram amamentados. A hipermetilação do *H19* levou à desregulação do *IGF2*, resultando em expressão bialélica, quando esse gene deve ser de expressão monoalélica paterna, aumentando assim as concentrações circulantes da proteína IGF2.[46] Maiores concentrações dessa proteína têm sido relacionadas ao maior risco de obesidade em adultos.[47] O mesmo padrão de metilação foi observado entre obesos e não obesos sobreviventes da fome holandesa e de seus descendentes do mesmo gênero[48] e em gambianos concebidos nas épocas de chuva em relação aos concebidos na época de seca.[49]

Em camundongos, a perda da expressão do gene *Gnas* em função de distúrbios no mecanismo de *imprinting* do alelo materno também pode levar ao desenvolvimento de obesidade e a sintomas de diabete tipo 2, como hiperglicemia, intolerância à glicose, hiperinsulinemia e resistência à ação da insulina. Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de obesidade nesse caso estão relacionados a defeitos na sinalização do receptor de melanocortina 4 (MC4R), o qual regula a atividade do sistema nervoso simpático (SNS), o metabolismo de glicose e a sensibilidade à insulina.[50-52] Nesses animais, a obesidade foi desenvolvida como consequência da redução do gasto de energia resultante da alteração na atividade do SNS, e não em decorrência do aumento da ingestão energética.[26]

Ainda em camundongos, a perda da expressão do gene imprintado *Peg3*, expresso paternalmente, também está relacionada com a diminuição do gasto energético,[53,54] enquanto a perda da expressão de *Ndn* e *Dlk1* e a superexpressão de *Peg1* estão relacionadas à obesidade por alterações no mecanismo de adipogênese, levando à hiperplasia do tecido adiposo branco.[55,56] A perda de expressão do gene imprintado *Magel2*, expresso pelo alelo paterno, também está envolvida no maior risco de desenvolvimento de diabete em razão da menor sensibilidade à insulina e do metabolismo prejudicado da leptina, hormônio que regula os mecanismos de fome e apetite.[54,57-60] Além disso, a perda de expressão do gene imprintado *Igf2*, especificamente no cérebro, leva os indivíduos a desenvolverem hipofagia, embora esses indivíduos apresentem aumento na deposição de gordura e maior suscetibilidade à obesidade, sugerindo que o efeito seja maior no metabolismo e não na ingestão energética.[61] O aumento na expressão do gene maternalmente imprintado *Grb10* está relacionado à diminuição do peso ao nascer e a sintomas como intolerância à glicose e resistência à insulina na vida adulta,[62] assim como o aumento na expressão do gene *Dlk1* paterno.[26,63]

As doenças cardiovasculares também podem ser programadas no início da vida, por meio de distúrbios em mecanismos de *imprinting* ocasionados pela exposição do feto a um ambiente intrauterino adverso.[64] Esses distúrbios podem promover alterações no desenvolvimento e na fisiologia do coração, com alteração no número de cardiomiócitos responsáveis pela contração muscular espontânea do órgão pelo espessamento da aorta e, por essa razão, considerado marcador de doença cardiovascular[65] ou vascularização inapropriada.[66] As primeiras observações surgiram de autópsias de fetos que apresentavam má-formação ou mau funcionamento do coração e cujas mães eram tabagistas ou apresentavam hipercolesterolemia.[67]

Nesse sentido, alterações nos mecanismos de *imprinting* dos genes *IGF1* e *IGF2* têm sido relacionadas ao aumento da suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Evidências apontam que o *IGF1* apresenta efeitos importantes na estrutura e no funcionamento do coração. A perda de expressão desse gene está relacionada à maior prevalência de doença isquêmica do coração e à maior mortalidade.[68,69] Por outro lado, a expressão bialélica de *IGF2* apresentou efeito na estrutura do coração, como cardiomegalia, ventrículo esquerdo aumentado, bradicardia e hipotensão.[70] *ZAC1* é um gene imprintado de expressão paterna e que recentemente foi associado ao desenvolvimento estrutural do coração. *ZAC1* é responsável pela ativação de promotores de genes como *MEF2C*, *GATA4* e *SRF*, que apresentam papéis essenciais no coração em desenvolvimento. Além disso, animais que têm o gene *Zac1* silenciado apresentam aumento significativo de células em apoptose no coração.[71] Em estudo que avaliou o padrão de metilação em indivíduos com aterosclerose, observou-se maior diferença de metilação em uma ilha CpG localizada na ICR do gene *H19*, além de alteração no padrão de metilação em dez genes não imprintados.[72] Além disso, em adultos, a alteração no padrão de metilação de genes como *INS* e *GNASAS* está relacionada à maior probabilidade de infarto do miocárdio.[67,73]

Imprinting e programação do câncer

Visto que os genes imprintados apresentam papel essencial no desenvolvimento normal do organismo, alte-

rações nos mecanismos de *imprinting* no início da vida têm sido relacionadas à maior suscetibilidade ao câncer na vida adulta. Essas observações são reforçadas pela presença de desregulação do *imprinting* no gene *IGF2* em pacientes com tumor de Wilms, um nefroblastoma que acomete somente crianças.[68]

Em humanos, a expressão anormal de genes imprintados costuma estar ligada à perda de *imprinting* e já foi observada em diversos tipos de câncer, mesmo na ausência de síndrome resultante de distúrbios de *imprinting*. O aumento na expressão de *IGF1* e *IGF2* é observado em diversas neoplasias, como as cerebrais, mamárias, gastrintestinais, pancreáticas e de ovário.[74] O aumento na expressão desses genes ocorre principalmente por meio da expressão bialélica, pela hipometilação de sua DMR e consequente perda de *imprinting*. Para alguns tipos de câncer, a perda de *imprinting* em *IGF1* e *IGF2* pode estar relacionada a um estágio específico da carcinogênese. Além disso, um aumento no número de lesões pré-neoplásicas de cólon está ligado ao aumento das concentrações circulantes da proteína IGF1, relacionada à transformação maligna das células e carcinogênese.[68]

Mesmo que a perda de *imprinting* no gene *IGF2* seja a mais frequentemente observada em casos de câncer, a expressão anormal de aproximadamente 30 genes imprintados já foi relatada, dentre os quais o *PLAG1*, silenciado por perda de *imprinting* em câncer de ovário; o *PEG10*, com expressão aumentada em hepatocarcinoma; o *MEST*, que apresenta perda de *imprinting* nos cânceres de pulmão, cólon e mama; e o *DLK1*, que apresenta alterações em marcas epigenéticas em diversos tipos de tumores humanos.[75,76]

No estudo Nest, avaliou-se de que forma a obesidade preconcepcional, tanto da mãe como do pai, estaria relacionada ao padrão de metilação das DMR do gene *IGF2* na progênie. Nesse estudo, os descendentes de pais obesos apresentaram hipometilação em três ilhas CpG na DMR do gene *IGF2*, relacionada à maior suscetibilidade ao desenvolvimento de câncer na infância, como tumor de Wilms, e na idade adulta, como câncer de cólon e ovário.[77,78] Nenhum efeito foi observado em relação à metilação nas DMR do *IGF2* de descendentes de mães obesas. Por outro lado, não houve diferença no padrão de metilação das DMR do gene imprintado *H19* nos descendentes de pais obesos em relação aos descendentes de pais não obesos, enquanto houve hipermetilação de quatro ilhas CpG na DMR do gene *H19* nos descendentes de mães obesas.[79]

Para entender melhor seu papel no câncer, é importante observar o padrão de expressão de genes imprintados em células-tronco, diferenciadas e neoplásicas, assim como as janelas no desenvolvimento relacionadas ao estabelecimento, à manutenção e à reprogramação do *imprinting*. Assim como qualquer alteração em mecanismos epigenéticos, as modificações em mecanismos de *imprinting* devem ser avaliadas em relação aos efeitos na expressão gênica e o resultado que isso apresenta na progressão da doença.

PROGRAMAÇÃO DE DOENÇAS CRÔNICAS NÃO TRANSMISSÍVEIS: OUTROS MECANISMOS EPIGENÉTICOS

Embora o mecanismo de *imprinting* genético seja importante no contexto de programação de DCNT, vale ressaltar que outros mecanismos estão relacionados a esse processo e vêm sendo amplamente estudados e destacados na literatura. Nesse sentido, a desregulação de mecanismos epigenéticos, como metilação de DNA e alterações pós-traducionais em histonas, ocasionadas por influências ambientais, podem afetar a expressão de genes não imprintados, que são de extrema importância para o desenvolvimento normal do organismo e que estão relacionados ao desenvolvimento de DCNT na idade adulta.[17]

Estudos epidemiológicos e em modelos experimentais com animais têm demonstrado a importância da nutrição materna e paterna no contexto de programação metabólica. Sendo assim, o hábito nutricional materno/paterno tem influência no padrão de expressão gênica de seus descendentes, com impacto na sua saúde. Por exemplo, em um estudo com ratos realizado por Borengasser et al.,[80] observou-se que a obesidade materna provocou em seus descendentes machos alterações na diferenciação do tecido adiposo branco e alterou o padrão de metilação global de DNA, ocasionando aumento na expressão de proteínas presentes em vias lipogênicas. Além disso, os descendentes apresentaram aumento na expressão do transportador de glicose 4 (GLUT4) e maior fosforilação de AKT, além de maior expressão de reguladores adipogênicos, como PPAR-gama, CCAAT, C/EBP-alfa e C/EBP-beta.[80] Outro estudo em modelo animal avaliou os níveis de expressão de *Zpf423* em descendentes de mães obesas ou não. O *Zpf423* é um fator de transcrição importante para células adipogênicas e que apresenta região promotora rica em ilhas CpG. Nesse caso, observou-se hipometilação na região promotora desse gene e maiores níveis de expressão de seu RNAm em animais cujas mães eram obesas, comparados com o grupo controle. Além disso, foi observada diminuição de marcas repressivas de histonas, como H3K27me3, e menor expressão de EZH2. Análises sobre perda ou ganho de função demonstraram que a *Zpf423* está relacionada à regulação e à diferenciação da adipogênese no início da vida e à programação de adiposidade e disfunção metabólica na vida adulta.[81]

Em análise epigenética de amostras de cordão umbilical de neonatos cujas progenitoras apresentavam diabete gestacional, observou-se redução dos níveis de metilação do gene imprintado *MEST* e do não imprintado *NRC31*, quando comparados com grupo controle. A hipometilação observada nesses genes estaria relacionada à maior predisposição para o desenvolvimento de obesidade na vida adulta desses descendentes.[82]

Em estudo realizado com primatas não humanos, observou-se redução da expressão de 55 microRNA e aumento da expressão de outros 25 em descendentes cujas mães foram expostas à dieta hiperlipídica e com alta concentração de frutose no período gestacional. MicroRNA são pequenos fragmentos de RNA não codificantes, que apresentam de 20 a 22 nucleotídeos e que têm a capacidade de controlar a expressão gênica por silenciar ou degradar RNAm. Dentre os microRNA com expressão alterada nesse estudo, 14 parecem estar relacionados com doenças cardiovasculares em humanos. Dos parâmetros mais afetados pela obesidade materna, destacaram-se o crescimento, a proliferação e a morte celular, os quais poderiam interferir no desenvolvimento do coração logo no início da vida e aumentar a suscetibilidade às doenças cardiovasculares na vida adulta.[83]

Em estudo realizado no Brasil, observou-se uma diminuição na incidência do câncer de mama quimicamente induzido em ratas que foram expostas à ração hiperlipídica à base de banha de porco no período gestacional. Essa alteração de suscetibilidade foi acompanhada de diminuição na expressão de Ki67, um marcador de proliferação celular, e da ativação do NF-kB, fator de transcrição relacionado com a ativação da resposta inflamatória. Também houve aumento na expressão de p21 e dos níveis globais de H3K9me3 nas glândulas mamárias de ratas expostas à ração hiperlipídica no período intrauterino, além de menor razão entre Rank/Rankl e Bcl-2/Bax.[84]

Embora a influência do ambiente materno na saúde e na programação de doenças nos descendentes seja mais bem descrita na literatura, estudos recentes têm mostrado que os hábitos alimentares paternos apresentam importante papel na reprogramação do epigenoma de sua progênie. Nesse sentido, observou-se que a ingestão de ração hiperlipídica por ratos machos causou disfunção de células beta-pancreáticas em seus descendentes, com menor secreção de insulina, mesmo na ausência de diabete. Esses efeitos foram acompanhados de alteração na expressão de 642 genes nas ilhas pancreáticas desses animais. Dos genes alterados, o que apresentou maior alteração foi o *Il13ra2*, relacionado ao câncer pancreático.[85] Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisadores observou que a ingestão de ração hiperlipídica por ratos machos causou a alteração na expressão de 5.108 genes no tecido adiposo retroperitoneal em seus descendentes. Esses genes pertencem a cinco vias principais relacionadas ao câncer: resposta mitocondrial e celular ao estresse, sinalização de telomerase, morte e sobrevivência celular, ciclo celular e crescimento e proliferação celular. Em comparação com o estudo anterior, foram observados 411 genes alterados tanto nas ilhas pancreáticas como no tecido adiposo, entre eles o *Myc*, um oncogene superexpresso em tecidos tumorais. Nesse caso, a ingestão de ração hiperlipídica por ratos machos levou ao envelhecimento precoce e a alterações degenerativas crônicas tanto no pâncreas como no tecido adiposo de suas filhas.

A ingestão de uma ração hipoproteica por ratos machos induz em seus descendentes a alteração na expressão de genes relacionados à biossíntese de colesterol e ao metabolismo de lipídios, como *PPAR*-alfa, *SREBP*, *KLF15* e *ZFP90*. Além disso, também foi observado aumento na expressão de genes relacionados à proliferação celular e à replicação de DNA, como o hormônio de crescimento (GH) e *IGF1*, o que caracteriza um estado hiperproliferativo em animais cujos pais foram expostos à ração hipoproteica. Observou-se, ainda, aumento na expressão de microRNA, como miR21 e miR199, relacionados à hepatocarcinogênese, e diminuição na expressão de miR210.[86]

PROGRAMAÇÃO METABÓLICA CEREBRAL

O cérebro está localizado no centro da regulação do metabolismo energético, graças à sua capacidade de modular a ingestão de alimentos, as preferências alimentares e o modo como nutrientes serão absorvidos e metabolizados por órgãos periféricos. No cérebro, a maioria, se não a totalidade, dessas atividades regulatórias é exercida direta ou indiretamente pelo hipotálamo. Essa estrutura cerebral, localizada acima da hipófise, é composta de uma dúzia de núcleos relativamente bem definidos, cujas funções fisiológicas foram caracterizadas graças a estudos fisiológicos e genéticos. Assim, demonstrou-se que o núcleo supraquiasmático (SCh) está envolvido na regulação do ritmo circadiano e que o núcleo paraventricular (PVN) modula a secreção hormonal da hipófise, enquanto os núcleos arqueado (ARC), dorsomedial (DMN), ventromedial (VNM) e a área lateral do hipotálamo (LHA) estão envolvidos na regulação da ingestão de alimentos.

Dados da literatura mostram que o ambiente nutricional no período perinatal do desenvolvimento tem consequências duradouras sobre a função das redes neurais que regulam a ingestão de alimentos, de modo que a ingestão de alimentos, o equilíbrio energético e, finalmente, o peso corporal são modificados ao longo da vida.[45] Demonstrou-se, assim, que filhotes nascidos de ratas ali-

mentadas com 50% da ração ingerida pelo grupo controle durante a gravidez e lactação apresentaram diminuição significativa no número de fibras a beta-endorfina no PVN.[87] Por outro lado, ratos com apenas 20 dias nascidos de mães submetidas a uma ração hipoproteica apresentaram aumento da densidade neuronal presente no VMN e no PVN.[88] No entanto, os efeitos da subnutrição perinatal no número ou na densidade das células e fibras neuronais são mais complexos porque esses animais também têm redução do número de neurônios NPY no ARC.

Outros autores demonstraram efeitos da restrição da ingestão alimentar materna na dessensibilização do efeito estimulatório de leptina e da insulina sobre a proliferação e a diferenciação neuronal na prole.[89] Por outro lado, em filhotes nascidos de mães alimentadas com ração hiperlipídica, a proliferação, a diferenciação e a migração celular no hipotálamo encontraram-se aumentadas.[90]

O excesso de alimentação neonatal induzido pela redução do número de filhotes por ninhada durante a lactação provoca alterações estruturais no ARC e PVN, resultando em hiperfagia, hiperinsulinemia e obesidade.[91,92] É interessante notar que todas essas alterações ocorrem na ausência de uma alteração significativa da massa cerebral. Isso é explicado porque, como órgão privilegiado, o tamanho do cérebro é pouco afetado pela subnutrição perinatal.[93] No entanto, dado o papel fundamental do hipotálamo na regulação do metabolismo e do comportamento alimentar, alterações, mesmo que sutis, na sua estrutura podem ter impacto deletério na homeostase de energia, levando ao desenvolvimento de obesidade. Ratos alimentados com ração pobre em proteínas durante a gestação parecem desenvolver preferência por alimentos ricos em lipídios, e esses efeitos são mais evidenciados na prole feminina.[94,95]

Mecanismos moleculares da programação metabólica cerebral

Alterações na expressão dos genes

Durante a gestação, a expressão temporária de genes em várias regiões do embrião é altamente controlada para garantir a sobrevivência e o desenvolvimento do indivíduo. Em um ambiente nutricionalmente restrito, a consequente redução da ingestão de energia ocasiona alterações na expressão gênica com o intuito de manter a viabilidade do feto. Essas mudanças adaptativas em órgãos chave do metabolismo na programação metabólica foram documentadas em vários modelos animais, incluindo roedores.

No hipotálamo, a subnutrição perinatal resultou em alteração na expressão de vários genes, evento descrito por vários grupos de pesquisa. Por exemplo, machos adultos nascidos de mães submetidas a restrição nutricional grave (70%) durante a gestação apresentam redução de expressão do receptor de leptina (*Ob –Rb*) associada com aumento na expressão do receptor de insulina (*Ir*).[96] Ademais, usando modelo de programação metabólica baseada na restrição na ingestão de proteínas durante a gestação e lactação, contata-se aumento na expressão dos genes que codificam neuropeptídeos orexígenos Npy e Agrp, bem como diminuição na expressão do gene que codifica o neuropeptídeo anorexígeno Pomc. Essas mudanças também estiveram associadas com aumento na massa de gordura visceral.[97] De maneira interessante, em ratos jovens (21-35 dias de vida), a expressão circadiana do perfil desses neuropeptídeos encontrou-se alterada.[98] Além disso, por meio da análise transcriptômica, foi identificada a desregulação da expressão de vários membros da família de receptores nucleares, bem como do corregulador da transcrição (PGC-1alfa) em ratos subnutridos com oito meses.[99] Uma vez que todos esses genes estão envolvidos na detecção e na utilização de lipídios como fonte de energia, essa observação sugere a existência de mecanismos de detecção e programação central do metabolismo lipídico por subnutrição perinatal. De acordo com essa ideia, outros autores relataram que a insuficiência uteroplacentária, induzida pela ligadura das artérias uterinas no 19º dia de gestação, resulta em aumento na expressão de CPT1 e ACC, duas enzimas essenciais do metabolismo lipídico, especialmente no hipotálamo de recém-nascidos.[100]

De forma geral, a análise dos efeitos metabólicos de programação na função cerebral mostra que a subnutrição perinatal induz aumento da ingestão de alimentos. A hiperfagia induzida por subnutrição perinatal é de curta duração. Após dois meses de idade, os animais subnutridos consomem a mesma quantidade de ração por dia que animais do grupo controle. No entanto, eles acabam desenvolvendo, aos 7 meses de idade, alterações corporais e metabólicas características da síndrome metabólica, embora tenham ingerido a mesma quantidade diária de ração desde os 2 meses de idade, comparados aos controles.[97] Essas observações indicam que a subnutrição perinatal programa o desenvolvimento de distúrbios metabólicos por meio de um mecanismo independente de seus efeitos sobre a ingestão de alimentos.

Mudanças epigenéticas

A possibilidade de que eventos epigenéticos possam constituir a base molecular da programação metabólica no hipotálamo tem sido motivo de pesquisa. Assim, Plagemman et al.[101,102] mostraram que ratos submetidos a

alimentação excessiva, por meio da redução da ninhada durante o período de lactação, apresentam aumento no nível de metilação na região promotora dos genes *POMC* e *IR*, associados à redução do nível de metilação da região promotora do gene *NPY*. Desse modo, o estresse nutricional durante o desenvolvimento pode induzir alterações epigenéticas no hipotálamo. No entanto, o número de estudos para determinar o impacto da programação nutricional sobre o perfil epigenético do hipotálamo é ainda limitado, de forma que ainda não é possível estabelecer relação causa-efeito entre essas alterações epigenéticas e muitas alterações na expressão dos genes descritos nessa região do cérebro e entre essas alterações epigenéticas e alterações na ingestão de alimentos descritos nos animais subnutridos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A área de pesquisa em nutrição materna e programação metabólica traz novas perspectivas para o estabelecimento de estratégias de redução do risco de DCNT, as quais deveriam ser iniciadas antes mesmo do nascimento. Nesse contexto, a ênfase deve ser direcionada para a elucidação de quais componentes da alimentação materna são capazes de programar o fenótipo de seus descendentes e por meio de quais mecanismos. Eventos epigenéticos, incluindo mas não limitados aos de *imprinting*, configuram-se como bastante promissores. Além disso, o melhor entendimento de em quais fases do desenvolvimento o epigenoma é especialmente suscetível à desregulação induzida pelo ambiente constitui área promissora de investigação. Por fim, o impacto das experiências paternas, incluindo a nutrição, na programação metabólica representa campo ainda pouco explorado e que deverá trazer luz a questões como herança epigenética e saúde da descendência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. [WHO] World Health Organization. WHO Library Cataloguing-in-Publication. Data Noncommunicable diseases country profiles 2014. Geneva: World Health Origanization; 2014.
2. Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. Diabetologia. 1992;35:595-601.
3. Barker DJ, Hales CN, Fall CH, Osmond C, Phipps K, Clark PM. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. Diabetologia. 1993;36:62-67.
4. Vaag AA, Grunnet LG, Arora GP, Brøns C. The thrifty phenotype hypothesis revisited. Diabetology. 2012;55:2085-88.
5. Hales CN, Barker DJP, Clark PM, Cox LJ, Osmond C, Winter PD. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. British Medical Journal. 1991;303:1019-22.
6. Barker DJ. The origins of the developmental origins theory. J Intern Med. 2007;261(5):412-7.
7. Perera F. Molecular epidemiology, prenatal exposure and prevention of cancer. Environmental Health. 2011;5(10 Suppl 1):S5.
8. Hilakivi-Clarke L, Assis S. Fetal origins of breast cancer. Trends in Endocrinology and Metabolism. 2006;1(9):340-48.
9. Hochberg Z, Feil R, Constancia M, Fraga M, Junien C, Carel JC et al. Child health, developmental plasticity and epigenetic programming. Endocrine Reviews. 2011;32(2):159-224.
10. Ravelli ACJ, van der Meulen JHP, Michels RPJ, Osmond C, Barker DJ, Hales CN, Bleker OP. Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. Lancet. 1998;351:173-77.
11. Hales CN, Barker DJP. The thrifty phenotype hypothesis. British Medical Bulletin. 2001;60:5-20.
12. Vallaud, P. O cerco de Leningrado. São Paulo: Contexto; 2012.
13. Eriksson J, Forsen T, Jaddoe VWV, Osmond C, Barker DJP. The effects of childhood growth and maternal body size on insulin resistance in elderly men and women. Diabelologica. 2002;45(3):342-48.
14. Hales CN, Barker DJP. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. International Journal of Epidemiology. 2013;42:1215-22.
15. Alfaradhi MZ, Ozanne SE. Developmental programming in response to maternal overnutrition. Frontiers in Genetics. 2001;2. doi: 10.3389/fgene.2011.00027.
16. Fullston T, McPherson NO, Owens JA, Kang WX, Sandeman LY, Lane M. Paternal obesity induces metabolic and sperm disturbances in male offspring that are exacerbated by their exposure to an “obesogenic” diet. Physiol Rep. 2015;3(3). (pii:e12336)
17. Ong TP, Moreno FS, Ross SA. Targeting the epigenome with bioactive food components for cancer prevention. Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics. 2011;4:275-92.
18. Zeisel SH. Epigenetic mechanisms for nutrition determinants of later healthoutcomes. American Journal of Clinical Nutrition. 2009;89(suppl):1488S-93S.
19. Burdge GC, Lillycrop KA. Nutrition, epigenetics and developmental plasticity: implications for understanding human disease. Annual Reviews of Nutrition. 2010;30:315-39.
20. Paldi A. What makes the cell differentiate? Progress in Biophysics and Molecular Biology. 2012;110(1):41-43.
21. Jirtle RL, Skinner MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. Nature Review Genetics. 2007;8:253-62.
22. Ko YG, Nishino K, Hattori N, Arai Y, Tanaka S, Shiota K. Stage-by-stage change in DNA methylation status of Dnmt1 locus during mouse early development. The Journal of Biological Chemestry. 2005;280(11):9627-34.
23. Hendrich B, Guy J, Ramsahove B, Wilson VA, Bird A. Closely related proteins MBD2 and MBD3 play distinctive but interacting roles in mouse development. Genes and Development. 2001;15(6):710-23.
24. Guy J, Hendrich B, Holmes M, Martin JE, Bird A. A mouse MeCP-2 null mutation causes neurological symptoms that mimic Rett syndrome. Nature Genetics. 2001;27(3):322-26.
25. Lambertini L. Genomic imprinting: sensing the environment and driving the fetal growth. Current Opinion Pediatric. 2014;26: 237-42.
26. Peters J. The role of genomic imprinting in biology and disease: an expanding view. Nature Reviews Genetics. Advanced Online Publication, 2014; doi:10.1038/nrg3766.
27. Bressan FF, De Bem TH, Perecin F, Lopes FL, Ambrosio CE, Meirelles FV et al. Unearthing the roles of imprinted genes in the placenta. Placenta. 2009;30:823-34.

28. Charalambous M, Rocha ST, Ferguson-Smith AC. Genomic imprinting, growth control and the allocation of nutritional resources: consequences for postnatal life. Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity. 2007;14:3-12.
29. Barlow DP. Genomic imprinting: a mammalian epigenetic discovery model. Annual Reviews of Genetics. 2011;379-403.
30. Horsthemke B. Mechanisms of imprint dysregulation. American Journal of Medicinal Genetics. 2010;154C:321-28.
31. Ferguson-Smith AC. Genomic imprinting: the emergence of an epigenetic paradigm. Nature Review Genetics. 2011;12:565-75.
32. Bartolomei MS, Ferguson-Smith AC. Mammalian genomic imprinting. Cold Spring Harb Perspective Biology. 2011;3:a002592.
33. Henckel A, Nakabayashi K, Sanz LA, Feil R, Hata K, Arnaud P. Histone methylation is mechanistically linked to DNA methylation at imprinting control regions in mammals. Human Molecular Genetics. 2009;18:3375-83.
34. Keverne EB, Curley JP. Epigenetics, brain evolution and behavior. Frontiers in Neuroendocrinol. 2008;29:398-412.
35. Albert M, Peters AH. Genetic and epigenetic control of early mouse development. Current Opinion in Genetics and Development. 2009;19:113-21.
36. Weaver JR, Bartolomei MS. Chromatin regulators of genomic imprinting. Biochemica & Biophysica Acta. 2014;1839(3):169-77.
37. Girardot M, Feil R, Llères D. Epigenetic deregulation of genomic imprinting in humans: causal mechanisms and clinical implications. Epigenomics. 2013;5(6): 715-28.
38. Nakamura T, Liu YJ, Nakashima H, Umehara H, Inoue K, Matoba S et al. PGC7 binds histone H3K9me2 to protect against conversion of 5mC to 5hmC in early embryos. Nature. 2012;486:415-19.
39. Li X, Ito M, Zhou F, Youngson N, Zuo X, Leder P et al. A maternal-zygotic effect gene, Zfp57, maintains both maternal and paternal imprints. Developmental Cell. 2008;15:547-57.
40. Horsthemke B. *In brief: genomic imprinting and imprinting diseases*. Journal of Pathology. 2014;232:485-87.
41. Horsthemke B. Epimutations in human disease. Current Topics in Microbiology and Immunology. 2006;310:45-59.
42. Roseboom T, de Rooij S, Painter R. The Dutch famine and its long-term consequences for adult health. Early Human Development. 2006;82:485-89.
43. Crespi B, Badcock C. Psychosis and autism as diametrical disorders of the social brain. Journal of Behavior and Brain Science. 2008;31:241-61.
44. Burton GJ, Folden AL. Review: The placenta and developmental programming: balancing fetal nutrient demands with maternal resource allocation. Placenta. 2012;33(Suppl):S23-7.
45. McMillen IC, Robinson JS. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. Physiol Rev. 2005;85:571-633.
46. Perkins E, Murphy SK, Murtha AP, Schildkraut J, Jirtle RL, Demark-Wahnefried W et al. Insulin-like growth factor 2/H19 methylation at birth and risk of overweight and obesity in children. The Journal of Pediatrics. 2012;161(1):32-39.
47. Fowke JH, Matthews CE, Yu H, Cai Q, Cohen S, Buchowski MS et al. Racial differences in the association between body mass index and serum IGF1, IGF2, and IGFBP3. Endocrine Related Cancer. 2010;17:51-60.
48. Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H, Blauw GJ, Susser ES et al. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. Proc Natl Acad Sci USA. 2008;105: 17046-49.
49. Waterland RA, Kellermayer R, Laritsky E, Rayco-Solon P, Harris RA, Travisano M et al. Season of conception in rural gambia affects DNA methylation at putative human metastable epialleles. PLoS Genetics. 2010;6:e1001252.
50. Chen M, Berger A, Kablan A, Zhang J, Gavrilova O, Weinstein LS. Gs-alfa deficiency in the paraventricular nucleus of the hypothalamus partially contributes to obesity associated with Gs-alfa mutations. Endocrinology. 2012;153: 4256-65.
51. Fan W, Dinulescu DM, Butler AA, Zhou J, Marks DL, Cone RD. The central melanocortin system can directly regulate serum insulin levels. Endocrinology. 2000;141:3072-79.
52. Obici S, Feng Z, Tan J, Liu L, Karkanias G, Rossetti L. Central melanocortin receptors regulate insulin action. The Journal of Clinical Investigation. 2001;108:1079-85.
53. Weinstein LS, Xie T, Qasem A, Wang J, Chen M. The role of GNAS and other imprinted genes in the development of obesity. International Journal of Obesity. 2010;34:6-17.
54. Curley JP, Pinnock SB, Dickson SL, Thresher R, Miyoshi N, Surani MA et al. Increased body fat in mice with a targeted mutation of the paternally expressed imprinted gene Peg3. The Faseb Journal. 2005;19:1302-04.
55. Fujiwara K, Hasegawa K, Ohkumo T, Miyoshi H, Tseng TH, Yoshikawa K. Necdin controls proliferation of white adipocyte progenitor cells. PLoS One. 2012;7:e30948.
56. Takahashi M, Kamei Y, Ezaki O. Mest/Peg1 imprinted gene enlarges adipocytes and is a marker of adipocyte size. American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism. 2005;288:E117-E124.
57. Mercer RE, Michaelson SD, Chee MJ, Atallah TA, Wevrick R, Colmers WF. Magel2 is required for leptin-mediated depolarization of POMC neurons in the hypothalamic arcuate nucleus in mice. PLoS Genetics. 2013;9:e1003207.
58. Tennese AA, Wevrick R. Impaired hypothalamic regulation of endocrine function and delayed counterregulatory response to hypoglycemia in Magel2-null mice. Endocrinology. 2011;152(3):967-78.
59. Bischof JM, Stewart CL, Wevrick R. Inactivation of the mouse Magel2 gene results in growth abnormalities similar to Prader--Willi syndrome. Human Molecular Genetics. 2007;16:2713-19.
60. Kozlov SV, Bogenpohl JW, Howell MP, Wevrick R, Panda S, Hogenesch JB, Muglia LJ, Van Gelder RN, Herzog ED, Stewart CL. The imprinted gene Magel2 regulates normal circadian output. Nat Genet. 2007;39(10):1266-72.
61. Jones BK, Levorse J, Tilghman SM. Deletion of a nuclease-sensitive region between the Igf2 and H19 genes leads to Igf2 misregulation and increase adiposity. Human Molecular Genetics. 2001;10(8):807-14.
62. Shiura H, Nakamura K, Hikichi T, Hino T, Oda K, Suzuki-Miqishima R et al. Paternal deletion of Meg1/Grb10 DMR causes maternalization of Meg1/Grb10 cluster in mouse proximal Chromossome 11 leading to severe pre and postnatal growth retardation. Human Molecular Genetics. 2009;18(8):1424-38.
63. Moon YS, Smas CM, Lee K, Villena JA, Kim KH, Yun EJ et al. Mice lacking paternally expressed Pref1/Dlk1 display growth retardation and accelerated adiposity. Molecular Cell Biollogy. 2002;22:5585-92.
64. Kelishadi R, Poursafa P. A review on the genetic, environmental, and lifestyle aspects of the early life origins of cardiovascular disease. Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care. 2014;44:54-72.

65. Zanardo V, Fanelli T, Weiner G, Fanos V, Zaninotto M, Visentin S et al. Intrauterine growth restriction is associated with persistent aortic wall thickening and glomerular proteinuria during infancy. Kidney International Supplements – Nature. 2011;80(1): 119-23.
66. Chang CP, Bruneau BG. Epigenetics and cardiovascular development. Annual Review Physiology. 2012;74:41-68.
67. Sun C, Burgner DP, Ponsonby AL, Saffery R, Huang RC, Vuillermin PJ et al. Effects of early-life environment and epigenetics on cardiovascular disease risk in children: highlighting the role of twin studies. Pediatric Research – Nature. 2013;73(4):523-30.
68. Bergman D, Halje M, Nordin M, Engström W. Insulin-like growth factor 2 in development and disease: a mini-review. Gerontology. 2013;59:240-49.
69. Colao A. The GH-IGF-1 axis and the cardiovascular system: clinical implications. Clinical Endocrinology. 2008;69:347-58.
70. Zaina S, Pettersson L, Thomsen AB, Chai CM, Qi Z, Thyberg J et al. Shortened life span, bradycardia and hypotension in mice with targeted expression of an IGF2 transgene in smooth muscle cells. Endocrinology. 2003;144:2695-703.
71. Yuasa S, Onizuka T, Shimoji K, Ohno Y, Kageyama T, Yoon SH et al. Zac1 is an essential transcription factor for cardiac morphogenesis. Circulation Research. 2010;106:1083-91.
72. Nazarenko MS, Puzyrev VP, Lebedev IN, Frolov AV, Barbarash OL, Barbarash LS. Methylation profiling of human atherosclerotic plaques. Molecular Biology. 2011;45(4):610-16.
73. Talens RP, Jukema JW, Trompet S, Kremer D, Westendorp RG, Lumey LH et al. Hypermethylation at loci sensitive to the prenatal environment is associated with increased incidence of myocardial infarction. International Journal of Epidemiology. 2012;41:106-15.
74. Cerrato F, Sparago A, Verde G, De Crescenzo A, Citro V, Cubellis MV et al. Different mechanisms cause imprinting defects at the IGF2/H19 locus in Beckwith-Wiedemann syndrome and Wilms' tumour. Human Molecular Genetics. 2008;17:1427-35.
75. Murrell A. Genomic imprinting and cancer: from primordial germ cells to somatic cells. Scientific World Journal. 2006;6: 1999-2010.
76. Murrell A, Ito Y, Verde G, Huddleston J, Woodfine K, Silengo MC, Spreafico F, Perotti D, De Crescenzo A, Sparago A, Cerrato F, Riccio A. Distinct methylation changes at the IGF2-H19 locus in congenital growth disorders and cancer. PLoS One. 2008;3(3):e1849.
77. Murphy SK, Huang Z, Wen Y, Spillman MA, Whitaker RS, Simel LR et al. Frequent IGF2/H19 domain epigenetic alterations and elevated IGF2 expression in epithelial ovarian cancer. Molecular Cancer Research. 2006;4:283-92.
78. Cui H, Onyango P, Brandenburg S, Wu Y, Hsieh CL, Feinberg AP. Loss of imprinting in colorectal cancer linked to hypomethylation of H19 and IGF2. Cancer Research. 2002;62:6442-46.
79. Soubry A, Schildkraut JM, Murtha A, Wang F, Huang Z, Bernal A et al. Paternal obesity is associated with IGF2 hypomethylation in newborns: results from a Newborn Epigenetics Study (Nest) cohort. BMC Medicine. 2013;11:29-39.
80. Borengasser SJ, Zhong Y, Kang P, Lindsey F, Ronis MJ, Badger TM et al. Maternal obesity enhances white adipose tissue differentiation and alters genome-scale DNA methylation in male rat offspring. Endocrinology. 2013;154(11):4113-25.
81. Yang QY, Liang JF, Rogers CJ, Zhao JX, Zhu MJ, Du M. Maternal obesity induces epigenetic modification do facilitate Zfp423 expression and enhances adipogenic differentiation in fetal mice. Diabetes. 2013;62(11):3727-35.
82. Hajj E, Pliushch G, Schneider E, Dittrich M, Müler T, Korenkov M et al. Metabolic programming of MEST DNA methylation by intrauterine exposure to gestational diabetes mellitus. Diabetes. 2013;62(4):1320-28.
83. Maloyan A, Muralimanoharan S, Huffman S, Cox LA, Nathanielsz PW, Myatt L et al. Identification and comparative analyses of myocardial miRNAs involved in fetal response to maternal obesity. Physiological Genomics. 2013;45(19):889-900.
84. Andrade FO, Fontelles CC, Rosim MR, Oliveira TF, Melo Loureiro AP, Mancino-Filho J et al. Exposure to a lar-based high-fat diet during fetal and lactation periods modifies breast cancer susceptibility in adulthood in rats. Journal of Nutritional Biochemestry. 2014;25(6):613-22.
85. Ng SF, Lin RC, Laybutt DR, Barres R, Owens JA, Morris MJ. Chronic high-fat diet in fathers programs beta-cells dysfunction in female rat offspring. Nature. 2010;467(7318):963-66.
86. Carone BR, Fauquier L, Habib N, Shea JM, Hart CE, Li R et al. Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. Cell. 2010;143: 1084-96.
87. Delahaye F, Breton C et al. Maternal perinatal undernutrition drastically reduces postnatal leptin surge and affects the development of arcuate nucleus proopiomelanocortin neurons in neonatal male rat pups. Endocrinology. 2008;49:470-75.
88. Plagemann A, Waas T et al. Hypothalamic neuropeptide Y levels in weaning offspring of low-protein malnourished mother rats. Neuropeptides. 2000;34:1-6.
89. Desai M, Li T et al. Hypothalamic neurosphere progenitor cells in low birth-weight rat newborns: neurotrophic effects of leptin and insulin. Brain Res. 2011;1378:29-42.
90. Chang GQ, Gaysinskaya V et al. Maternal high-fat diet and fetal programming: increased proliferation of hypothalamic peptide-producing neurons that increase risk for overeating and obesity. J Neurosci. 2008;28:12107-19.
91. Davidowa H, Li Y et al. Differential response to NPY of PVH and dopamine-responsive VMH neurons in overweight rats. Neuroreport. 2002;13:1523-27.
92. Davidowa H, Li Y et al. Altered responses to orexigenic (AGRP, MCH) and anorexigenic (alpha-MSH, CART) neuropeptides of paraventricular hypothalamic neurons in early postnatally overfed rats. Eur J Neurosci. 2003;18:613-21.
93. Desai M, Crowther NJ, Lucas A, Hales CN. Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers. Br J Nutr. 1996;76(4):591-603.
94. Bellinger L, Langley-Evans SC. Fetal programming of appetite by exposure to a maternal low-protein diet in the rat. Clin Sci. 2005;109:413-20.
95. Bellinger L, Lilley C, Langley-Evans SC. Prenatal exposure to a maternal low-protein diet programmes a preference for high-fat foods in the young adult rat. Br J Nutr. 2004;92(3):513-20.
96. Breton C, Lukaszewski MA, Risold PY, Enache M, Guillemot J, Rivière G, Delahaye F, Lesage J, Dutriez-Casteloot I, Laborie C, Vieau D. Maternal prenatal undernutrition alters the response of POMC neurons to energy status variation in adult male rat offspring. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009;296(3):E462-72.
97. Orozco-Sólis R, Lopes de Souza S, Barbosa Matos RJ, Grit I, Le Bloch J, Nguyen P, Manhães de Castro R, Bolaños-Jiménez F. Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of

the developmental programming of feeding. Physiol Behav. 2009;96(3):481-92.

98. Orozco-Solís R, Matos RJ, Lopes de Souza S, Grit I, Kaeffer B, Manhães de Castro R, Bolaños-Jiménez F. Perinatal nutrient restriction induces long-lasting alterations in the circadian expression pattern of genes regulating food intake and energy metabolism. Int J Obes (Lond). 2011;35(7):990-1000.

99. Orozco-Solis R, Matos RJ et al. Nutritional programming in the rat is linked to long-lasting changes in nutrient sensing and energy homeostasis in the hypothalamus. PLoS One. 2010;5:e13537.

100. Puglianiello A, Germani D et al. Changes in the expression of hypothalamic lipid sensing genes in rat model of intrauterine growth retardation (IUGR). Pediatr Res. 2007;61:433-37.

101. Plagemann A, Roepke K et al. Epigenetic malprogramming of the insulin receptor promoter due to developmental overfeeding. J Perinat Med. 2010;38:393-400.

102. Plagemann A, Harder T et al. Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. J Physiol. 2009;587:4963-76.

Nutrigenômica e exercício físico | 31

Marcelo Macedo Rogero
Francisco Leonardo Torres-Leal

INTRODUÇÃO

O desempenho físico resulta de complexas interações que envolvem fatores fisiológicos, bioquímicos, psicológicos, entre outros. Pesquisas realizadas nos últimos anos têm aumentado o conhecimento a respeito da resposta do organismo perante o treinamento físico nos âmbitos celular, subcelular e molecular. Evidências científicas demonstram que a resposta ao treinamento físico pode ser influenciada pelo padrão de variações genéticas individuais. Nesse sentido, o principal desafio é determinar como as variações genéticas e a interação entre os genes e fatores ambientais – por exemplo, hábitos alimentares – podem influenciar respostas observadas no que se refere às alterações fisiológicas induzidas pelo treinamento físico.[1] Nesse contexto, alguns fatores devem ser considerados:

- A resposta ao treinamento é altamente heterogênea e pode ser influenciada por múltiplos componentes, incluindo fatores genéticos.
- Diversos genes influenciam o desempenho e a resposta mediante o treinamento físico.
- O aumento ou a redução da expressão de diferentes genes induzidos pelo exercício físico agudo promovem alterações no metabolismo pós-exercício.
- A influência das variações genéticas sobre o desempenho pode ser dependente do contexto em que se insere o treinamento físico. Por exemplo, a predisposição genética para a hipertrofia muscular pode ser apenas evidente após determinado tipo de treinamento de força, cuja magnitude do ganho de massa muscular é também dependente da alimentação (Figura 31.1).

Aliado a esses fatos, destaca-se o fato de as adaptações fisiológicas induzidas pelo treinamento físico serem dependentes, em parte, da alimentação. A interação entre genes, nutrição e exercício físico é altamente complexa (Figura 31.2). Estudos que visam determinar a ingestão adequada de macronutrientes em atletas raramente atentam-se aos aspectos da nutrigenômica e da nutrigenética, cuja abordagem poderia ampliar os efeitos fisiológicos induzidos pelo treinamento físico.

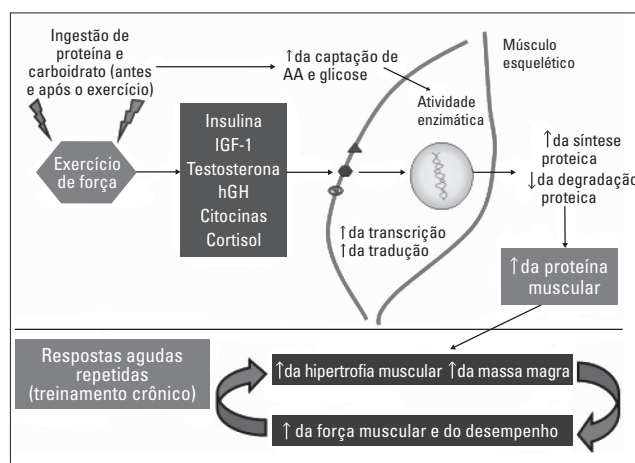



Figura 31.1 Efeitos agudos e crônicos do treinamento de força no organismo. AA: aminoácidos; hGH: hormônio do crescimento; IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina 1. **Fonte:** adaptada de Volek.[2]

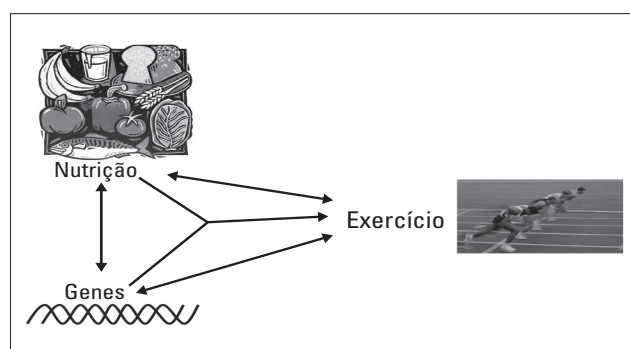



Figura 31.2 Inter-relação entre nutrição, genes e exercício físico. **Fonte:** adaptada de Heck et al.[3]

EXERCÍCIO FÍSICO

A manutenção da aptidão aeróbia e da força muscular esquelética por meio do treinamento físico pode prevenir e reduzir o risco de surgimento de doenças metabólicas. Esses benefícios são intercedidos, em parte, pelo grande remodelamento metabólico e molecular do músculo esquelético em resposta ao exercício físico. A prática de exercício físico de resistência (aeróbio) e de força gera diferentes respostas fisiológicas, que são mediadas por uma complexa interação de diversas vias de sinalização, reguladoras da transcrição gênica e da tradução de proteínas.

O comportamento sedentário é um conhecido, mas modificável, fator de risco que contribui para o surgimento de doenças relacionadas ao estilo de vida e responsáveis por muitas causas de "mortes evitáveis".[4] Em todo o mundo, cerca de um em cada três adultos e quatro em cada cinco adolescentes não alcançam a quantidade recomendada e a intensidade adequada de exercício físico diários.[5] As recomendações atuais em saúde pública reconhecem o exercício físico regular e a atividade física como marcos na prevenção e na redução do risco de diversas doenças crônicas, como hipertensão, doença cardíaca coronariana, obesidade, diabete melito tipo 2 (DM2) e perda de massa muscular relacionada ao envelhecimento (sarcopenia).[6,7]

Os benefícios atribuídos à prática de exercício físico são amplamente reconhecidos, à medida que evidências demonstram que o treinamento físico de curto prazo pode reverter parcialmente a progressão de doenças metabólicas,[8] enquanto intervenções no estilo de vida que também incorporam o aumento da atividade física permanecem na linha de frente como ações preventivas contra doenças metabólicas.[9] Além disso, o exercício físico regular combinado com a intervenção nutricional é mais bem-sucedido quando comparado com a intervenção farmacológica no tratamento e na prevenção de DM2[9] e sarcopenia.[10] Embora os benefícios advindos das adaptações ao exercício físico regular sejam amplamente conhecidos, as descobertas relacionadas aos efeitos moleculares são recentes e contemplam vias de sinalização que regulam e coordenam as respostas adaptativas ao exercício físico.

EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE O METABOLISMO DOS CARBOIDRATOS

Os carboidratos são os substratos primeiramente utilizados na contração muscular durante o exercício físico de alta intensidade.[11] Em tecidos de origem animal, são armazenados na forma de glicogênio. O fígado apresenta as maiores concentrações de glicogênio, mas, em virtude de sua massa, o músculo esquelético representa as maiores reservas de glicogênio. O tamanho das reservas de glicogênio hepático e muscular é influenciado pela interação entre a prática de exercício físico e a ingestão de carboidratos.[12,13]

Durante o exercício físico, o glicogênio muscular e o hepático são mobilizados, sendo a utilização do glicogênio no músculo e o aumento da captação de glicose dependentes do aumento da intensidade do exercício físico.[9] Em exercício físico de intensidade superior a 50 a 60% do consumo máximo de oxigênio (VO_2máx), o glicogênio muscular é o principal substrato para o metabolismo oxidativo.[11,14] Quando a duração do exercício físico é prolongada, as concentrações de glicogênio hepático e muscular diminuem e são acompanhadas do aumento da captação de glicose, até que esta se torne limitada pela significativa redução de glicemia. A baixa disponibilidade de glicogênio intramuscular e a hipoglicemia estão associadas com o desenvolvimento de fadiga durante os exercícios físicos prolongados extenuantes.[15]

Além disso, reconheceu-se que a intensidade e a duração do exercício físico são os principais determinantes da captação de glicose muscular (Figura 31.3) e que a glicose circulante poderia ser responsável por até 40% do metabolismo oxidativo durante o exercício físico quando este é prolongado e o glicogênio muscular está depletado.[16-18] Por fim, a identificação do transportador de glicose 4 (GLUT4), que é regulado pela insulina e pela contração muscular,[19-21] abriu caminho para compreender melhor as bases moleculares do transporte de glicose no sarcolema e a captação de glicose muscular durante o exercício.

GENES, EXERCÍCIO E SUAS ADAPTAÇÕES NO MÚSCULO ESQUELÉTICO

Para melhor compreensão da relação existente entre genes, alterações no tecido muscular esquelético e benefícios do exercício físico à saúde, é importante definir os tipos de exercício físico a que o tecido muscular humano é sensivelmente responsivo. Em termos gerais, podem ser considerados três cenários distintos:

- A contração muscular repetitiva, que remodela o tecido, considerada fenômeno de resistência.
- A contração muscular reduzida pelo comportamento sedentário, resultando na perda combinada da resistência muscular e área de seção transversa.
- A contração muscular intensa, realizada com pouca frequência, para estimular a hipertrofia muscular.

Além desses cenários serem opostos, as adaptações moleculares no músculo esquelético, a partir dos estímulos alcançáveis por meio do treinamento de força e de

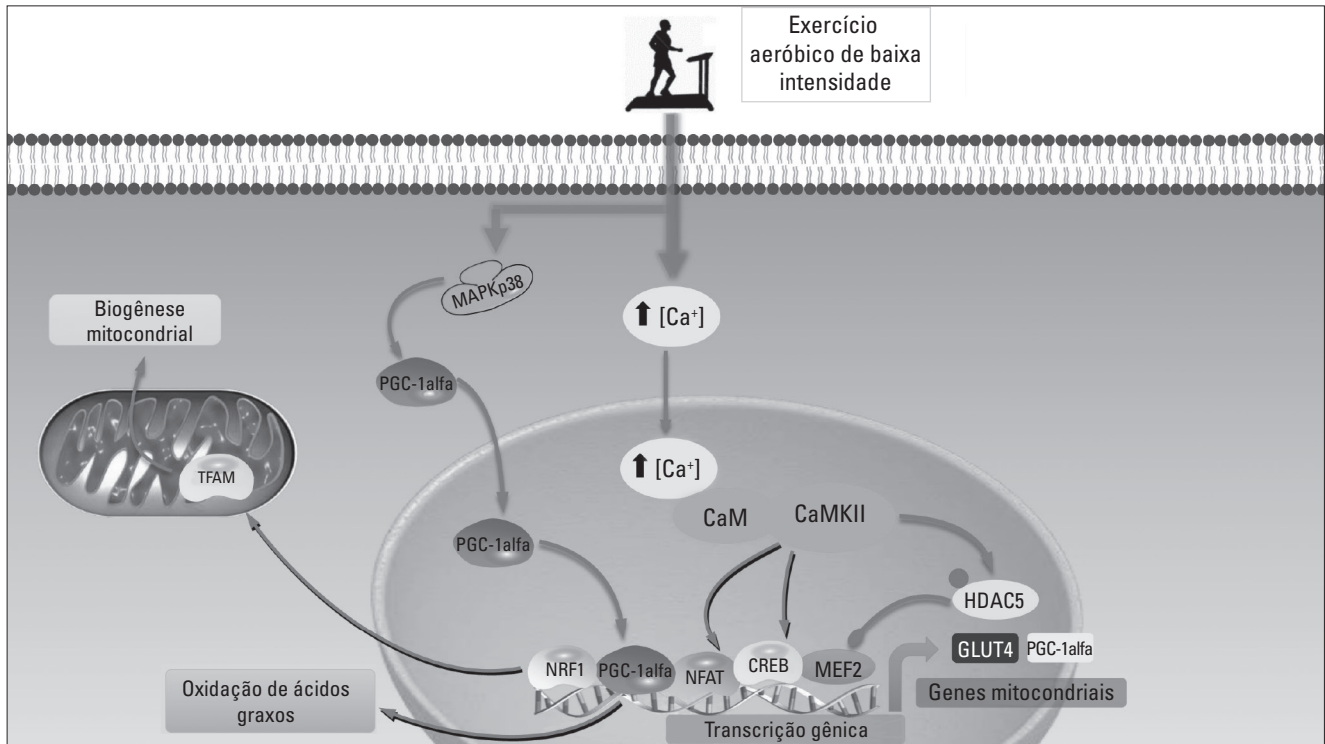



Figura 31.3 Modelo de ativação da via Ca/CaM a partir de exercício de resistência de baixa intensidade e seus efeitos sobre a capacidade oxidativa do músculo esquelético. Ca^+: cálcio; CaM: calmodulina; CAMKII: proteína quinase dependente de calmodulina do tipo II; CREB: proteína de ligação ao elemento de resposta do AMPc; GLUT4: transportador de glicose do tipo 4; HDAC5: histona desacetilase; MAPKp38: proteína quinase ativada por mitógeno p38; MEF2: fator potencializador de miócito 2; NFAT: fator nuclear de ativação de células T; NRF1: fator respiratório nuclear 1; PGC-1alfa: coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferação do peroxissoma; TFAM: fator de transcrição mitocondrial A. **Fonte:** adaptada de Egan e Zierath.[22]

resistência, se sobrepõem ao estilo de vida sedentário, apesar de sua alta prevalência. Assim, os sinais moleculares e a expressão de genes reguladores são suscetíveis de ser, em certa medida, comuns a todas as formas de exercício voluntário. Por outro lado, os processos de regulação que ocorrem no músculo durante períodos de sedentarismo foram explorados apenas nas últimas décadas,[23] em nível de detalhe comparável com as intervenções de exercício. As evidências são de que as respostas moleculares dentro do músculo esquelético no sedentarismo não são necessariamente uma simples condição "oposta" à observada com o aumento da atividade muscular.[24-27]

A capacidade aeróbia é um dos preditores mais poderosos de todas as causas de mortalidade e é compreendida pela capacidade de resistência do músculo esquelético e do sistema cardiovascular.[28] A ideia de que o fenótipo do músculo esquelético pode ter impacto sobre a aptidão metabólica está bem estabelecida,[29] pois a perda de peso e a sensibilidade à insulina foram correlacionadas com maior capacidade oxidativa do músculo esquelético.[30] O que não está claro é precisamente o quanto do fenótipo do músculo esquelético é determinado por fatores ambientais, como a atividade física, e quanto é geneticamente predeterminado.

Evidências indicam que variações no gene do substrato do receptor de insulina (*IRS1*) estão associadas com o DM2 e a resistência à insulina,[31] principalmente quando essa variação ocorre no músculo esquelético. Esse tecido é o maior órgão-alvo da insulina no corpo e, em indivíduos saudáveis, o local de maior utilização de glicose após uma refeição. Essas evidências destacam a existência de aumento de "risco" genético, que é impulsionado principalmente quando essa variação genética é avaliada no músculo esquelético, em vez de, por exemplo, em relação à resistência à insulina hepática. É oportuno considerar que os efeitos do treinamento físico não se limitam ao músculo esquelético, mas também a outros órgãos críticos para a aptidão cardiovascular e metabólica, como o pâncreas.[32]

Outra consideração importante é que o tipo de treinamento de resistência é considerado estímulo importante para as mudanças cardiovasculares e metabólicas. Além disso, é importante relatar que esse tipo de treinamento, quando realizado em alta intensidade, pode proporcionar alterações moleculares mais profundas, em comparação ao treinamento de resistência de menor intensidade,[32,33] o que, entretanto, não é verdadeiro para todos os tipos de treinamento de resistência,[32] especial-

mente quando o volume de treinamento é também elevado.[34,35]

Ensaios clínicos e randomizados controlados com exercício (volume *versus* intensidade) têm demonstrado o que é necessário para reduzir os fatores de risco para DM2. Por exemplo, as intervenções de estilo de vida (incluindo a atividade física), sem dúvida, previnem ou retardam o desenvolvimento de DM2 em indivíduos com intolerância à glicose.[9,36] Isso pode ser explicado por eventos moleculares; no entanto, a redução dos fatores de risco para essa doença tem ainda de ser claramente traduzida para reduções na ocorrência de doenças cardiovasculares,[37,38] o que deve ser considerado importante quando se leva em conta a relação entre genes, mecanismos moleculares e redução do risco de doenças.

Desse modo, as melhorias do potencial aeróbio, juntamente com a maior capacidade de transporte da glicose no músculo em exercícios de intensidade muito alta, indicam que existe relação entre a duração e a frequência da contração muscular e as respostas moleculares verificadas no músculo esquelético humano. Destaca-se também o volume de treinamento e a amplitude de mudanças nos sinais moleculares, que devem influenciar, de alguma forma, a atividade muscular e traduzir em respostas moleculares relativamente comuns, como o aumento da expressão de GLUT, o aumento da capacidade mitocondrial e a melhoria na função vascular.[39]

Diante desse contexto, os treinamentos de resistência e de força são comumente utilizados como estratégia para melhorar a saúde cardiovascular[40] e ambos os tipos de exercício físico podem favorecer mudanças fisiológicas que se sobrepõem.[41] Além disso, pode-se determinar que eles ativam vias moleculares semelhantes relacionadas ao músculo esquelético em indivíduos com o mesmo perfil fisiológico. Esse aspecto é muito importante à medida que possamos entender como o tipo de exercício físico interage com o perfil genético para reduzir, de forma otimizada, a morbidade e a mortalidade.

Adaptações musculares ao treinamento de resistência: efeito dos genes reguladores

O cálcio é responsável por regular a sinalização da calcineurina no músculo esquelético, sendo esse o mecanismo mais promissor da conexão entre ativação muscular e adaptação advindas do treinamento de resistência.[42-44] Essa resposta é reflexo da conexão entre estímulos nervosos crônicos, fluxo crônico em canais de cálcio e remodelação do tipo de fibra muscular esquelético para um fenótipo oxidativo.[45] Além disso, compreende-se que a ativação da calcineurina fosfatase intercedida pelo cálcio tem ligações diretas com o remodelamento do tecido muscular,[44] bem como na promoção da hipertrofia de miócitos.[46]

O primeiro gene candidato – que não só promove a expressão das isoformas lentas de cadeia pesada de miosina[44] como também ativa a biogênese mitocondrial, via proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina (CaMK) – é o coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador do peroxissoma (*PGC1*A) no músculo esquelético.[47] O PGC-1 alfa apresenta potencial para integrar os estímulos do treinamento de força e resistência, ajudando a explicar alguns dos benefícios sobrepostos de ambos os tipos de exercício. Curiosamente, existem algumas evidências de que a deleção do par base-5 (5I/5D) na região promotora do gene da calcineurina faça que os indivíduos sejam muito mais sensíveis aos estímulos de hipertrofia cardíaca, o que resulta em quadro de hipertensão.[48]

Um dos fenótipos musculares observados com a ativação da calcineurina é uma pequena conversão de fibras de contração rápida para fibras de contração lenta, podendo esse processo ser revertido pela administração de ciclosporina.[46] Essa mudança nas proteínas (actina e miosina) diretamente envolvidas no processo contrátil é raramente encontrada em seres humanos,[49] enquanto as adaptações metabólicas que a acompanham representam a característica mais comum de remodelação do músculo, que é em direção ao maior potencial oxidativo, aumento do número e densidade mitocondrial e pela maior sensibilidade à insulina.[50] A calsarcina-2 tem sido identificada como regulador negativo da sinalização da calcineurina exclusivamente em fibras de contração rápida do músculo esquelético; sua ausência resulta na conversão para fibras oxidativas de contração lenta.[51]

Outras evidências experimentais também são encontradas para outro mecanismo importante no fenótipo muscular, que é o tamponamento do cálcio. A superexpressão da proteína parvalbumina que tampona o cálcio nas fibras lentas, por exemplo, em sóleo, resultou na redução da atividade de enzima mitocondrial (succinato desidrogenase) e na mudança de propriedade contrátil, sem qualquer alteração significativa na expressão da miosina de cadeia pesada.[52] Essa observação sugere que existe resposta graduada de cálcio como mediador de sinalização da remodelação do músculo esquelético, em que fenótipos metabólicos e de resistência à fadiga não necessitam da substituição completa das isoformas de miosina, o que é consistente com as alterações observadas nos seres humanos submetidos a treinamento de resistência.

A avaliação das famílias CaMK (proteína quinase dependente de calmodulina) no músculo esquelético humano indica que CaMKII e CaMK quinase,[53] em vez de CaMKIV,[54] podem ser responsáveis por detectar os sinais

de remodelamento muscular a partir da realização de exercícios de resistência. A CaMKII é rapidamente fosforilada durante exercícios de resistência e sua atividade permanece ativada durante 90 minutos de exercícios de resistência em humanos. Em contraste, a expressão de CaMKIV não pode ser detectada no músculo esquelético humano.[53] Embora tenha sido observado que a CaMKII esteja majoritariamente localizada na fração citosólica, evidências destacam que ela possa regular a expressão do fator de resposta ao soro (SRF) e do fator potencializador de miócito 2 (MEF2)[55] e, portanto, plausivelmente regular, em longo prazo, os aspectos relacionados ao fenótipo muscular.

Ligações entre mudanças na expressão gênica muscular e na CaMKII em resposta ao exercício são apoiadas pelas observações de McGee et al.,[56] em estudo que relacionou modificações em histonas (alterações epigenéticas) que ocorrem durante o exercício físico aeróbio e sinalização de CaMKII. A acetilação das histonas resulta na abertura da cromatina, o que facilita a expressão de genes. Desse modo, demonstrou-se que a atividade da histona desacetilase (HDAC5) é reduzida no músculo esquelético humano após a realização de exercício físico e que as histonas se encontram significativamente acetiladas.[57]

A HDAC5 é exportada para o núcleo e, posteriormente, é alvo da degradação no proteossoma, de tal forma que o HDAC classe II tem sido sugerido como um candidato para facilitar a resposta transcricional a partir do efeito do exercício de resistência agudo no músculo esquelético.[57] A CaMKII é considerada um potente regulador da fosforilação e, portanto, da distribuição de HDAC5 dentro da célula,[56] o que sugere a existência de maior ativação da CaMKII muscular pelo exercício de resistência.[53] Permanece a ser determinado se esses mecanismos são responsáveis por todas as alterações em longo prazo[58] no transcriptoma do músculo esquelético pelo treinamento de resistência. Alguns dos reguladores mais estudados do fenótipo do músculo esquelético são o PGC-1alfa[59] e a proteína quinase ativada pelo AMP (AMPK).[60] A ativação tanto da AMPK quanto do PGC-1alfa ocorre em resposta ao treinamento de resistência[61] e ao exercício intervalado de alta intensidade;[62] ambos estimulam a biogênese mitocondrial e a resistência aeróbica. Além disso, a ativação de PGC-1alfa ocorre, em parte, por meio da proteína quinase ativada por mitógeno p38 (MAPK),[62,63] que é também ativada pelo exercício.[64]

Foi inicialmente demonstrado que a superexpressão de PGC-1alfa poderia elevar a expressão de fibras de contração lenta.[59] Em combinação com seu papel na determinação da capacidade oxidativa no tecido adiposo marrom e na conexão entre adipócitos marrons e miócitos,[65] o PGC-1alfa tem sido amplamente estudado por seu potencial de influenciar a ação da insulina no músculo esquelético e o desempenho muscular.[66] Por exemplo, roedores *knockout* para o gene *Pgc1a* no músculo esquelético apresentaram perda de fibras do tipo I (contração lenta) e perda da capacidade de executar o exercício.[67] Esse mesmo modelo demonstrou prejuízo na homeostase glicêmica, apesar de manter a sensibilidade à insulina. Há pouco mais de uma década, pensava-se que ocorria redução na regulação do PGC-1alfa especificamente no músculo esquelético de pacientes diabéticos tipo 2,[68] e isso poderia ocorrer em razão do sedentarismo;[65] no entanto, destaca-se que essa hipótese não é reproduzível.[69] Além disso, em humanos, quando o PGC-1alfa é superexpresso no músculo esquelético, a densidade mitocondrial é aumentada cerca de 10 vezes com o treinamento de resistência.[70]

Desse modo, os benefícios resultantes da ativação de PGC-1alfa durante exercícios de resistência em seres humanos ainda precisam ser determinados. Além disso, ainda não está claro se o PGC-1alfa está envolvido na regulação de expressão de genes no músculo de indivíduos que praticam exercício de resistência.[58,71] Em modelo de roedores, existe forte indicativo de que o músculo esquelético pode responder ao treinamento de resistência, sendo esse fenômeno capaz de regular positivamente componentes do proteoma mitocondrial.[72] Também é interessante salientar que os estudos com PGC-1alfa destacam sua grande capacidade de regulação do metabolismo oxidativo quando existe aumento em sua expressão; entretanto, quando o PGC-1alfa é removido, suas ações podem ser compensadas por fatores ainda não totalmente identificados. Acredita-se que fatores mitocondriais adicionais, como fatores de transcrição mitocondrial A (TFAM), B1 (TFB1M) e B2 (TFB2M), também sejam regulados no músculo esquelético humano após 10 dias de treinamento de resistência,[73] enquanto a proteína TFAM é regulada, em grande parte, com 4 semanas de treinamento de resistência, resultando em aumento significativo na quantidade de proteínas.[61,74] Entretanto, não está claro se qualquer um desses fatores limita ou determina a magnitude das alterações mitocondriais com o treinamento de resistência. Ademais, a capacidade oxidativa mitocondrial ultrapassa a taxa metabólica do músculo esquelético, pois durante o estado de repouso ainda existe gasto energético significativo,[75] e o impacto das alterações na capacidade mitocondrial máxima para a saúde metabólica ainda não está bem esclarecido.

Efeitos do exercício de resistência sobre a AMPK

Outro alvo de grande interesse para a melhoria da capacidade oxidativa por exercícios aeróbios é a AMPK, que

tem sido postulada como um sensor energético essencial durante o exercício físico. A ativação dessa proteína é decorrente das alterações na concentração de monofosfato de adenosina (AMP) e é capaz de ativar eventos transcricionais que ocorrem após o exercício físico (Figura 31.4). No músculo esquelético humano, apenas três complexos foram detectados: alfa2beta2gama1 (65% do conjunto total), alfa2beta2gama3 (20%) e alfa1beta2gama1 (15%).[76]

Uma mutação (R225W) que ocorre no gene que codifica a subunidade PRKAG3 AMPKgama3 foi relatada em seres humanos,[77] causando aumento da deposição de glicogênio no músculo esquelético. Estudos recentes revelaram também que cada combinação de heterotrímero exibe perfil distinto de ativação em resposta ao exercício físico no músculo esquelético humano, com complexos contendo gama3 (alfa2beta2gama3 heterotrímero, compreendendo 20% do *pool* total de AMPK) predominantemente ativados[76] e heterotrímeros alfa2beta2gama1 e alfa1beta2gama1 (compreendendo 80% do *pool* total de AMPK) inalterados ou ativados somente após o exercício prolongado.[78] Além disso, a especificidade que os complexos contendo alfa2 têm de se translocar para o núcleo, em resposta à contração do músculo, expande as respostas decorrentes da ativação da AMPK em efeitos transcricionais no músculo esquelético exercitado.[79] Durante o exercício físico, os complexos contendo alfa1 são ativados quando comparados com complexos contendo alfa2. Recentemente, pesquisadores demonstraram funções distintas de heterotrímeros específicos da AMPK, ao evidenciarem diferentes sítios de fosforilação no músculo humano exercitado.[80]

Um dos principais efeitos catabólicos do exercício físico é a oxidação de ácidos graxos. Os resultados experimentais com modelos animais têm fornecido evidências convincentes para o papel importante da AMPK na regulação do metabolismo de ácidos graxos no músculo esquelético. Tem-se demonstrado que a ativação da AMPK induzida por contração e por medicamentos estimula a oxidação de ácidos graxos no músculo esquelético.[81-84]

Verificou-se, recentemente, em camundongos *knock-in* (ACC2) que a AMPK estimula a oxidação de ácidos graxos no músculo esquelético, por meio de fosforilação e de redução da atividade da acetil-coenzima A carboxilase 2 (ACC2), enzima que catalisa a carboxilação da acetil-CoA para malonil-CoA, um intermediário metabólico envolvido na regulação da oxidação de ácidos graxos.[85] Contudo, existem controvérsias sobre o papel da AMPK na regulação da oxidação de ácidos graxos no músculo esquelético, em razão da dissociação entre sua ativação, a fosforilação

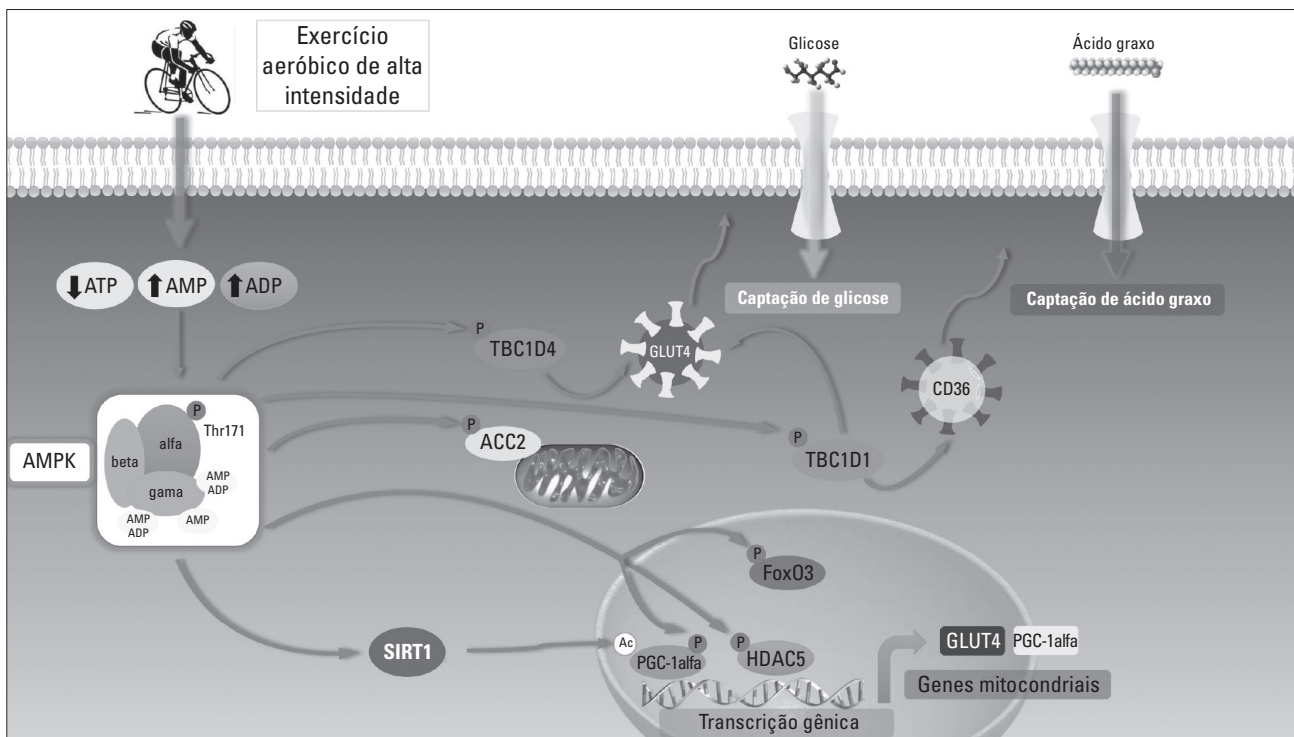



Figura 31.4 Representação esquemática das adaptações metabólicas a partir de exercícios de resistência de alta intensidade envolvendo a proteína quinase ativada pelo AMPK. ACC2: isoforma mitocondrial da acetil-CoA caboxilase; ADP: difosfato de adenosina; AMP: monofosfato de adenosina; AMPK: proteína quinase ativada pelo AMP; ATP: trifosfato de adenosina; CD36: receptor *scavenger* da classe B; FoxO3: subclasse 3 do fator de transcrição da forquilha; GLUT4: transportador de glicose do tipo 4; HDAC5: histona desacetilase 5; P: fosforilação; PGC-1alfa: coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferação do peroxissoma; SIRT1: sirtuína 1; TBC1D1: isoforma da AS160. TBC1D4: membro 1 da família de domínio TBC1; Thr171: resíduo 171 de treonina. **Fonte:** adaptada de Mounier et al.[86]

da ACC e a concentração de malonil-CoA redutase durante o exercício prolongado em seres humanos,[87] indicando que a oxidação de lipídios muscular não seria completamente dependente da via AMPK/ACC. Estudos com animais transgênicos, com atividade de AMPK comprometida no músculo esquelético, levaram à conclusão de que essa quinase não está diretamente envolvida na regulação da oxidação de ácidos graxos durante o exercício,[88-90] mas que a fosforilação da ACC no músculo desses animais pode contribuir para adaptações metabólicas a partir de eventos contráteis; assim, a contribuição da via AMPK/ACC não pode ser desconsiderada. Dessa forma, mais estudos envolvendo o uso de modelos mecanicistas são necessários para compreender plenamente a contribuição da AMPK muscular na oxidação de ácidos graxos durante o exercício.

Outro mecanismo para melhorar a utilização de ácidos graxos envolve a translocação do transportador de ácidos graxos FAT/CD36 (*fatty acid translocase/cluster of differentiation 36*) para a membrana plasmática, para regular a incorporação de ácidos graxos nas células musculares. Embora estudos anteriores indiquem que a AMPK não seja essencial na regulação da translocação do FAT/CD36 e na captação de ácidos graxos durante a contração muscular,[91,92] demonstrou-se que camundongos deficientes em AMPKalfa1alfa2 muscular têm prejuízo na utilização de ácidos graxos durante o exercício.[93]

Durante o exercício, a contração do músculo esquelético aumenta a captação de glicose de forma dependente da intensidade para sustentar a demanda energética causada pelo *turnover* de trifosfato de adenosina (ATP). Esse aumento na captação de glicose pelo músculo esquelético é impulsionado pelo aumento do fluxo sanguíneo, bem como da translocação do GLUT4 para a membrana plasmática. Os mecanismos conhecidos apontam que a contração do músculo esquelético é estímulo mais potente na captação de glicose pelo músculo esquelético em comparação à insulina e que os mecanismos moleculares que regulam o transporte de glicose via insulina e exercício são distintos.[94] No entanto, descobertas recentes têm mostrado uma convergência desses sinais via substrato da AKT de peso molecular 160 kDa (subunidades TBC1D1 e TBC1D4), que vêm ganhando destaque, por serem consideradas essenciais na captação de glicose tanto pelo estímulo da insulina quanto da contração no músculo esquelético.[95-97] Também é importante observar que, ao contrário da captação de glicose dependente da insulina, a captação de glicose mediada pela AMPK não é prejudicada no diabete tipo 2 durante o exercício físico.[98]

A AMPK tem se destacado por ser considerada um elemento fundamental nos efeitos do treinamento físico, principalmente pela sua capacidade de regular a transcrição do GLUT4 e de genes envolvidos na biogênese mitocondrial.[99] O aumento na expressão do *GLUT4* é dependente da fosforilação da AMPK e da transcrição da HDAC5, seguida do exercício.[100] O controle transcricional da biogênese mitocondrial é mediado pela regulação do PGC-1alfa, tanto no DNA nuclear quanto no mitocondrial. A ativação da AMPK favorece a estimulação do PGC-1alfa por fosforilação direta,[101] mas também envolve sua desacetilação por meio da sirtuína 1 (SIRT1), favorecendo o desencadeamento de adaptações do músculo esquelético induzidas pelo exercício físico.[102]

Efeito do exercício de resistência sobre o perfil de citocinas

A contração do músculo tem emergido como um importante ativador da síntese e da secreção de citocinas e de outros peptídeos, conhecidos como miocinas, que pode exercer efeitos autócrinos, parácrinos ou endócrinos. Essas miocinas têm sido consideradas mediadoras das adaptações do organismo ante o exercício físico e exerceriam efeitos na regulação do metabolismo e da sinalização no músculo esquelético, bem como em órgãos distantes do seu local de produção. A interleucina 6 (IL-6) é reconhecida como a primeira miocina, contribuindo para a adaptação metabólica muscular e para os efeitos benéficos do exercício físico.[103] Cabe destacar que várias evidências surgiram demonstrando que a IL-6 estimula o transporte de ácidos graxos e a oxidação de glicose no músculo esquelético de maneira dependente da AMPK.[104]

Outras miocinas, como IL-8 e IL-15, destacaram-se por aumentar o transporte de glicose por meio do aumento da fosforilação da AMPK.[105] Semelhantemente, a irisina, uma miocina recém-descoberta, é capaz de favorecer o "escurecimento" (*browning*) de adipócitos a partir de estímulos advindos do exercício. Além disso, essa miocina tem ação direta sobre o metabolismo do músculo esquelético, também por meio da ativação da AMPK.[106]

De forma interessante, verifica-se que a expressão de irisina no músculo esquelético é controlada por uma cascata de sinalização via AMPK-PGC-1alfa, sugerindo a existência potencial de um ciclo de *feedback* positivo.[107] A ativação da AMPK por fármacos também tem sido envolvida no mecanismo que regula a produção e a secreção de IL-6 no músculo esquelético isolado.[108] Entretanto, evidências mais recentes indicam que AMPKalfa2 seria dispensável para secreção de IL-6 estimulada pela contração muscular.[109]

Efeitos do treinamento de força sobre *turnover* muscular

Todas as formas de contração muscular são resultado da aplicação de tensão (força) ao longo de um músculo

ativo. O princípio de sobrecarregar o músculo é o elemento básico para o desenvolvimento de adaptações que resultam no consequente crescimento muscular (hipertrofia). Esse fenômeno é conhecido como síntese de proteínas do músculo esquelético (SPME) e é regulado pela ativação do complexo 1 da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTORC1), da proteína ribossomal S6K (p70S6K) e dos alvos a jusante (Figura 31.5).[110] A p70S6K é um regulador chave da SPME, por meio de vias canônicas de tradução de proteínas e de biogênese do ribossomo, envolvendo a proteína ligadora (4E-BP1) do fator de iniciação eucariótico 4E (eIF4E) e o fator de alongamento eucariótico 2 (eEF2). A fosforilação da 4E-BP1 pelo mTORC1 suprime sua ligação ao eIF4E e, posteriormente, permite que o eIF4E ligue-se diretamente à extremidade 5' do RNAm para, por fim, formar um complexo eIF4F ativo, o que faz dela uma etapa limitante da velocidade de iniciação da tradução. A fosforilação de S6K promove a fosforilação da proteína S6 da subunidade ribossomal 40S (rpS6) e da eIF4B. Coletivamente, esses eventos conduzem à formação do complexo de iniciação da tradução e ativam a síntese de proteínas para a hipertrofia muscular.[111]

A regulação mecanossensorial da SPME é determinada por contrações de alta intensidade durante a realização de exercício de força.[112] Esse tipo de contração, transitoriamente, altera o sarcolema (a bicamada lipídica que envolve a célula do músculo), aumentando a concentração de ácido fosfatídico na membrana fosfolipídica, por meio da ativação da fosfolipase D. O ácido fosfatídico ativa o mTORC1, por meio da interação com o seu domínio de FRB,[113] resultando na ativação de mTORC1 e SPME.[114] Contrariamente, a inibição da fosfolipase D é capaz de reduzir a ativação da mTORC1, por comprometer os aumentos nas concentrações de ácido fosfatídico na membrana.[114,115] A regulação da SPME por mecanossensores também envolve a proteína quinase de adesão focal (FAK), uma classe de receptores transmembrana que atuam como proteínas tirosina quinases. As proteínas FAK são elementos chave para a transmissão dos sinais contráteis no músculo esquelético e são componentes centrais da sinalização de integrina – proteínas de adesão presentes na membrana celular. A expressão e a atividade da FAK no músculo esquelético estão relacionadas com a intensidade da carga de trabalho aplicada.[116,117] Além disso, as contrações podem

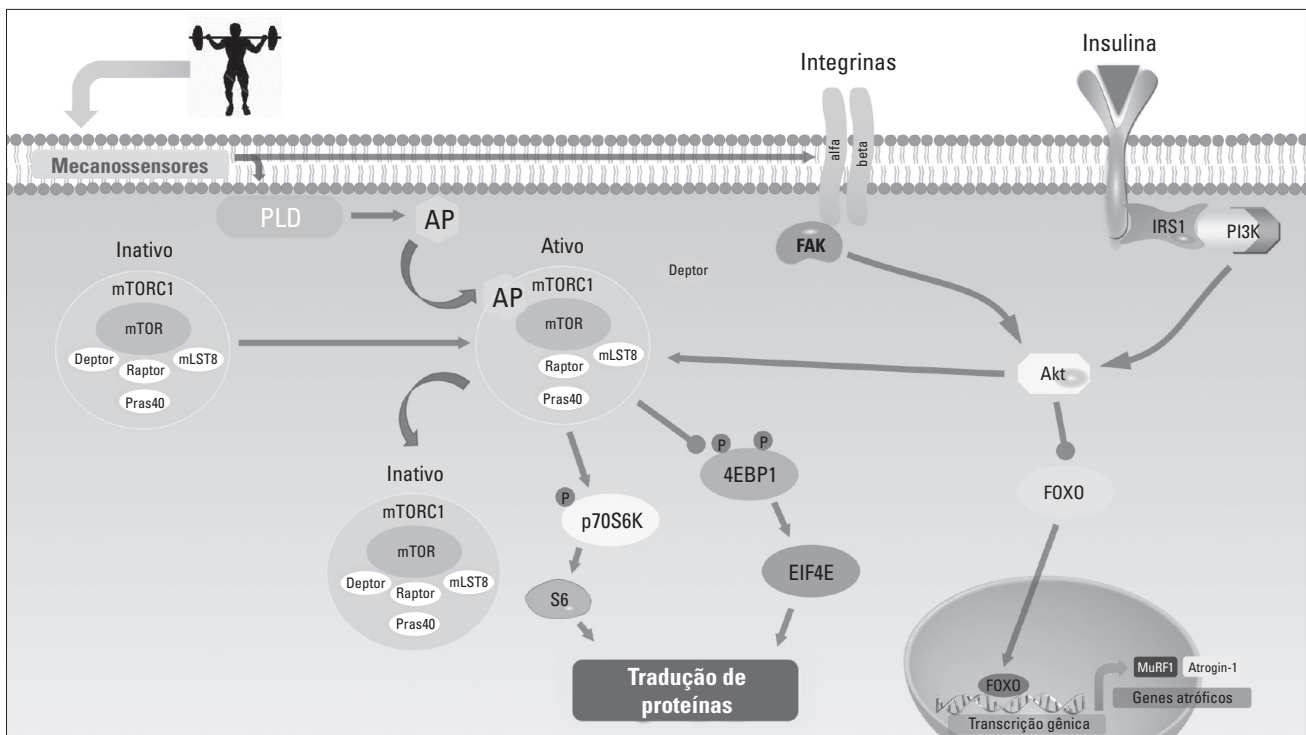



Figura 31.5 Representação esquemática da via de síntese proteica no músculo esquelético envolvendo o complexo 1 da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTORC1) e a via de ativação da degradação proteica envolvendo ativação de FOXO. 4EBP1: proteína de ligação do fator de iniciação eucariótico 4E 1; Akt ou PKB: proteína quinase B; AP: ácido fosfatídico; Deptor: proteína de interação que contém o domínio mTOR; EIF4E: fator de iniciação eucariótico 4E; FAK: proteína quinase de adesão focal; FOXO: fator de transcrição da forquilha; IRS1: substrato do receptor de insulina 1; mLST8: subunidade beta da proteína GTPase; MuRF1: *muscle RING-finger protein-1* ou atrogina; mTOR: alvo da rapamicina em mamíferos; mTORC1: complexo 1 da proteína alvo da rapamicina em mamíferos; P: fosforilação; p70S6K: proteína-70 ribossomal S6 quinase; PI3K: quinase fosfatidilinositol 3; PLD: fosfolipase D; Pras40: substrato de Akt rico em prolina de 40 kDa; Raptor: regulador associado à proteína TOR; S6: quinase S6. **Fonte:** adaptada de Egan e Zierath.[22]

promover alterações conformacionais e de atividade da fosfotransferase da FAK,[117,118] capazes de ativar a SPME por meio de mecanismos dependentes e independentes de mTORC1.[112]

Durante a resposta adaptativa de hipertrofia induzida por exercício de força, o controle da tradução e da síntese proteica é controlado positivamente, enquanto a ativação e a incorporação de células satélites facilitam a adição de novas miofibrilas formadas para a maquinaria contrátil. Considerando-se que a importância da síntese de proteínas é superior à degradação ao longo de um período prolongado, o grau de hipertrofia muscular induzida pelo exercício de força está fortemente associado com o grau de fosforilação da p70S6K.[119,120] A maior atividade da p70S6K induzida pela contração muscular é dependente de mTORC1, que integra estímulos de nutrientes e metabólitos para regular o crescimento e a proliferação celular. A ativação dessa via, pela contração muscular, por meio da via mecanossensorial, como anteriormente mencionado, conduz os processos de tradução, por aumentar a taxa de SPME e, portanto, a hipertrofia do músculo por meio do aumento proteico.[121]

A ativação do mTORC1 é crítica para o crescimento muscular induzido pela sobrecarga do treinamento, como demonstrado pela atenuação das respostas hipertróficas e da síntese de proteínas pelo inibidor de mTORC1, a rapamicina.[110] A via do mTORC1 controla mecanismos de síntese de proteínas em vários níveis, tanto pela capacidade de tradução quanto pela eficiência, por meio de aumentos da tradução de RNAm específicos e, posteriormente, pelo aumento da fibra muscular esquelética.

Regulação da degradação proteica no músculo esquelético

A regulação da degradação proteica no músculo esquelético depende, principalmente, da atividade da via da ubiquitina-proteassoma (Figura 31.5). Esse fenômeno ocorre por meio da ação de duas ligases de ubiquitina E3 específicas do músculo: a atrogina 1, também conhecida como MAFbx (atrogina-1/MAFbx), e a RNAm muscular 1 (MuRF1), que são reguladores fundamentais da proteólise muscular em condições catabólicas.[111] Por exemplo, a degradação da miosina de cadeia pesada é regulada por ubiquitinação MuRF1-dependente.[122] Nesse modelo, a ativação (desfosforilação) dos fatores de transcrição FOXO leva ao aumento transcricional de MAFbx/atrogina-1 e MuRF1.[123] A translocação e a ativação de membros FOXO são necessárias para o aumento da regulação de atrogina-1/MAFbx e MuRF1, enquanto a FOXO3 é suficiente para promover a expressão de atrogina-1/MAFbx e a atrofia muscular *in vivo*.[123] A atividade de FOXO é regulada principalmente por mudanças pós-traducionais que determinam sua localização subcelular, ou seja, a fosforilação por AKT promove a exportação nuclear de FOXO para o citoplasma. Desse modo, a AKT atua como quinase chave no balanço de síntese e degradação proteica muscular. O papel dessa via está firmemente estabelecido na atrofia muscular, mas não tão bem definido com relação à degradação de proteínas durante a hipertrofia – ou nas alterações transitórias no balanço proteico durante e após uma única sessão de exercício de força. Estudos que utilizaram protocolos com exercício físico agudo e que avaliaram a expressão de genes proteolíticos em resposta a exercício aeróbio ou de força demonstram maior expressão de RNAm de MuRF1 2 a 4 horas pós-exercício, enquanto a de RNAm de atrogina-1/MAFbx tende a permanecer elevada até 12 horas após o término do exercício.[124,125]

CARBOIDRATOS E PROTEÍNA DO SORO DO LEITE: RELAÇÕES COM O EXERCÍCIO FÍSICO E A NUTRIGENÔMICA

Carboidratos

Tanto o glicogênio muscular quanto a glicose sanguínea representam substratos fundamentais para a ressíntese de ATP na fibra muscular durante o exercício físico. A importância da disponibilidade de carboidratos durante o exercício prolongado é enfatizada pela ocorrência da fadiga física estar associada com a depleção da concentração de glicogênio muscular e/ou com a hipoglicemia. A diminuição dos estoques endógenos de carboidratos resulta em redução da concentração de piruvato, que atua tanto como substrato para a formação de acetil-CoA quanto em reações de fornecimento de intermediários do ciclo de Krebs (anaplerose), as quais são necessárias para a oxidação de ácidos graxos. Além disso, a utilização de carboidratos pela célula muscular permite a realização de exercícios em intensidades que superam 50 a 60% do VO_2máx.[126,127]

Transportadores, índice glicêmico e exercício físico

Diversos transportadores de glicose têm sido caracterizados, dentre os quais seis são denominados transportadores de glicose dependentes de sódio (SGLT1-6) e outros treze realizam o transporte facilitado desse monossacarídeo. Cabe ressaltar que a presença de grande número de diferentes transportadores de monossacarídeos e, em particular, dos treze transportadores distintos de monossacarídeos indica que a captação de glicose para dentro da célula é um fenômeno altamente complexo. Além disso, a expressão de diversas isoformas de transportadores de glicose, em diferentes tecidos e células,

demonstra as características diversificadas de cada um dos vários transportadores, o que fornece alto grau de especificidade no controle da captação de glicose em diferentes condições fisiológicas, ou seja, em ampla faixa em relação à concentração plasmática de glicose.[128,129] Dentre as proteínas transportadoras de glicose no tecido muscular, verifica-se que o GLUT-1 está presente na membrana plasmática das células musculares. Visto que esse transportador se localiza no sarcolema, independentemente da estimulação com insulina e/ou da contração muscular, observa-se que sua principal função é manter o transporte basal de glicose. O GLUT-4 é o mais abundante e relevante transportador de glicose no músculo esquelético e é translocado a partir de um estoque intracelular para o sarcolema e para o sistema de túbulos T, após estimulação da insulina ou pela contração muscular.[130-132]

Algumas proteínas da membrana plasmática têm sido identificadas como possíveis transportadoras de ácidos graxos de cadeia longa em células de mamíferos: a proteína ligadora de ácidos graxos (FABPpm), a translocase de ácidos graxos (FAT/CD36) e a proteína de transporte de ácidos graxos (FATP). Dentre elas, constata-se que a FAT/CD36 (88 kDa) tem alta afinidade por ácidos graxos livres e compete efetivamente por eles quando estão ligados à albumina. A presença de RNAm para FAT/CD36 no músculo esquelético indica que essa proteína contribui para a captação de ácidos graxos de cadeia longa.[133-135]

Diversos estudos têm avaliado o efeito do índice glicêmico dos alimentos sobre o metabolismo e o desempenho quando consumidos em diferentes momentos antes do exercício prolongado. Alguns deles demonstram melhora do desempenho quando alimentos de baixo índice glicêmico são consumidos antes ou imediatamente antes do exercício.[136-139] Todavia, há escassez de estudos que avaliem o efeito do índice glicêmico sobre a expressão gênica no músculo esquelético de indivíduos submetidos a uma sessão de exercício físico.

O efeito do índice glicêmico sobre a expressão dos genes que codificam o GLUT-4 e a FAT/CD36 no tecido muscular foi avaliado em um estudo realizado com oito indivíduos, os quais pedalaram, durante uma hora, a 75% do VO_2máx e ingeriram, imediatamente após o exercício, refeições isocalóricas, com alto e baixo índice glicêmico, que continham proporções similares de carboidratos, lipídios e proteínas. Após o exercício, verificou-se que a expressão do RNAm do GLUT-4 foi reduzida em ambas as intervenções, enquanto a expressão proteica do GLUT-4 não foi alterada. Os níveis de RNAm e de proteína para a FAT/CD36 foram significativamente diminuídos com a intervenção contendo alto índice glicêmico quando comparados aos valores obtidos no período basal. A intervenção contendo baixo índice glicêmico não influenciou os níveis de RNAm e de proteína da FAT/CD36. Esse resultado indica que diferenças no índice glicêmico da refeição pós-exercício são suficientes para alterar o metabolismo lipídico.[140]

Ingestão de carboidratos e expressão de IL-6 no tecido adiposo

Durante o exercício físico, constata-se aumento da expressão gênica da IL-6 no músculo esquelético e da concentração plasmática dessa citocina, sendo esse aumento diretamente relacionado à redução do conteúdo muscular de glicogênio. Por outro lado, a ingestão de carboidratos durante o exercício físico atenua o aumento da concentração plasmática de IL-6, indicando a presença de regulação induzida pelo substrato no músculo esquelético. A IL-6 é também liberada a partir do tecido adiposo em resposta ao exercício físico e apresenta efeito lipolítico, o que pode favorecer a mobilização de energia, na forma de ácidos graxos, a partir do tecido adiposo, durante o exercício físico.[141,142]

Keller et al.[143] investigaram o efeito do exercício físico e da suplementação de carboidratos sobre a expressão gênica da IL-6 no tecido adiposo. Para tanto, oito indivíduos saudáveis pedalaram durante três horas (60% da carga máxima de trabalho), com ingestão de 250 mL de uma solução de 6% de carboidratos ou placebo a cada 15 minutos. A expressão gênica da IL-6 no tecido adiposo e a concentração plasmática dessa citocina aumentaram em resposta ao exercício. Contudo, a suplementação de carboidrato reduziu a expressão gênica da IL-6 no tecido adiposo e a concentração plasmática da IL-6 no final do exercício.

Proteínas do soro do leite

Proteínas do soro do leite e caseína apresentam diferentes propriedades digestivas. A caseína apresenta esvaziamento gástrico mais lento em comparação às proteínas do soro do leite, o que permite denominá-la como uma proteína *slow* e as proteínas do soro do leite como proteínas *fast*. Aminoácidos provenientes da caseína aparecem no sangue mais lentamente e o pico aminoacídico sanguíneo apresenta menor magnitude, apesar de a resposta perdurar por mais tempo em comparação à ingestão de proteínas do soro do leite.[144]

Estudos em humanos demonstram que o efeito anabólico da ingestão de proteínas está relacionado ao aumento da concentração de aminoácidos livres no sangue, o que acarreta maior disponibilidade de aminoácidos para o músculo esquelético. Em indivíduos cuja capacidade de anabolismo proteico foi reduzida pela ausência de ingestão de energia não proteica, a ingestão de proteí-

nas *fast* (proteínas do soro do leite ou mistura de aminoácidos) induziu aumento significativo da concentração de aminoácidos livres no sangue. Tal fato resultou em aumento marcante do catabolismo de aminoácidos e na estimulação temporária da síntese proteica corporal. Por outro lado, quando aminoácidos foram fornecidos de modo mais contínuo, ou seja, por meio da ingestão de caseína ou em pequenas refeições frequentes, verificou-se que o catabolismo de aminoácidos não foi estimulado, uma vez que o aumento da concentração de aminoácidos no sangue foi moderado. Além disso, observou-se menor degradação proteica corporal e maior retenção de aminoácidos provenientes da alimentação nos tecidos esplâncnicos com a ingestão de proteínas *slow* em comparação às do tipo *fast*. Cabe ressaltar que a ingestão simultânea de energia não proteica combinada com a suplementação de proteínas promove menor diferença entre as respostas sobre o *turnover* proteico decorrentes da ingestão de proteínas *slow* e *fast*, em razão de a velocidade de digestão diferir menos ou pelo fato de a ingestão de energia adicional reduzir as diferenças no catabolismo de aminoácidos entre as duas situações.[145-148]

Em um estudo no qual foi avaliado o efeito da ingestão de uma bebida contendo 20 g de caseína ou 20 g de proteínas do soro do leite sobre o anabolismo proteico muscular uma hora após uma sessão de exercício de força, verificou-se que a ingestão aguda pós-exercício de ambas as proteínas resultou em aumentos similares no balanço proteico muscular. Portanto, a ingestão de caseína e de proteínas do soro do leite após o exercício de força estimula o saldo de síntese proteica muscular por meio do fornecimento de aminoácidos indispensáveis, ao mesmo tempo em que representa uma estratégia nutricional efetiva para promover a hipertrofia muscular.[149]

Burke et al.[150] verificaram que homens suplementados com proteína do soro do leite (1,2 g/kg de massa corporal) apresentaram maior aumento da massa corporal magra em comparação ao grupo placebo após seis semanas de treinamento de força. Cabe ressaltar que, nesse estudo, a ingestão total de proteínas foi cerca de duas vezes maior no grupo suplementado com proteínas do soro do leite que no grupo placebo (2,1 *versus* 1,2 g de proteína/kg de massa corporal).

Proteína do soro do leite e regulação da expressão gênica da miostatina

A miostatina é um membro da superfamília do TGF e atua como regulador negativo da massa muscular em humanos e em outros mamíferos. A miostatina atua por meio de diferentes receptores de activina, dos quais a activina IIb parece ser o mais relevante. Nesse contexto, constata-se que a miostatina inibe o crescimento da massa muscular por meio da diminuição da proliferação e diferenciação de células-satélites, bem como pela atenuação da síntese proteica muscular. A célula-satélite, por sua vez, é regulada, em parte, por fatores regulatórios miogênicos, como a miogenina e a MyoD (*myogenic differentiation 1*), bem como por ciclinas dependentes de quinases (cdk), como a cdk2, que são inibidas pelos inibidores de cdk, como p21 e p27.[151-154]

Em um estudo realizado com indivíduos submetidos a treinamento de força, foi investigado se a ingestão de 15 g de proteína do soro do leite, antes e após o treinamento de força, teria influência sobre a expressão gênica da miostatina e de proteínas envolvidas com o ciclo celular (p21 e cdk2). Biópsias do músculo vasto lateral foram obtidas no repouso, 1 e 48 horas após a realização de cinco séries, de dez repetições cada, do exercício denominado *leg press*. A expressão gênica da miostatina diminuiu após a realização da sessão de exercício de força apenas no grupo controle. Por outro lado, a expressão gênica da cdk2 aumentou apenas no grupo suplementado com proteína do soro do leite. Esses resultados indicam que a expressão gênica da miostatina e de proteínas relacionadas ao ciclo celular é afetada por uma única sessão de exercício de força. Essas respostas podem ser modificadas pela ingestão de proteínas do soro do leite.[155] Uma possível hipótese para esse efeito decorre do fato de que a diminuição da expressão da miostatina observada no grupo placebo pode atuar como mecanismo protetor contra a degradação proteica. Por outro lado, esse mesmo mecanismo não é necessário quando há ingestão de proteína, uma vez que esse nutriente promove aumento do balanço proteico corporal. Nesse sentido, conclui-se que o controle da ingestão alimentar é crucial durante a realização de estudos que investiguem o efeito do exercício físico sobre a expressão gênica.

Proteína do soro do leite e perfil de expressão gênica muscular global

A ingestão da proteína do soro do leite hidrolisada acarreta maior aumento da síntese proteica muscular em comparação à ingestão de aminoácidos com composição idêntica em relação à proteína do soro do leite. Aliado a esse fato, verifica-se que a ingestão de carboidratos e proteínas pós-exercício promove melhor recuperação dos estoques de glicogênio em relação à ingestão isolada de carboidratos.[156,157]

Considerando os aspectos supracitados, Kanda et al.[158] investigaram o efeito da ingestão de proteína do soro do leite hidrolisada sobre a expressão gênica global muscular. Para tanto, animais nadaram por um período de duas horas e, imediatamente após, foram alimentados com: ração con-

tendo proteína hidrolisada; carboidrato + mistura de aminoácidos; e carboidratos. Uma hora após o término do exercício, o músculo epitroclear foi retirado e utilizado para a análise de *microarray* (30 mil genes). Os resultados evidenciaram que a ingestão da proteína do soro do leite hidrolisada alterou a expressão de 189 genes, com destaque para o aumento da expressão de genes envolvidos com o reparo muscular pós-exercício, bem como ativou duas proteínas *upstream*, a proteína quinase regulada por sinais extracelulares 1/2 (ERK 1/2) e o fator induzido pela hipóxia-1alfa (HIF-1alfa), os quais podem atuar como fatores chave para a regulação da expressão gênica relacionada à ingestão da proteína do soro do leite hidrolisada (Figura 31.6).

COMPOSTOS BIOATIVOS DE ALIMENTOS E MICRONUTRIENTES: RELAÇÕES COM O EXERCÍCIO FÍSICO E A NUTRIGENÔMICA

Quercetina

As plantas contêm milhares de compostos fenólicos, incluindo mais de 5 mil flavonoides que exibem forte atividade antioxidante. Flavonóis são os mais difundidos flavonoides nos alimentos, sendo o principal a quercetina. Dentre as fontes de quercetina, destacam-se cebola, maçã, mirtilo, couve-flor, chás e brócolis. A ingestão total de flavo-

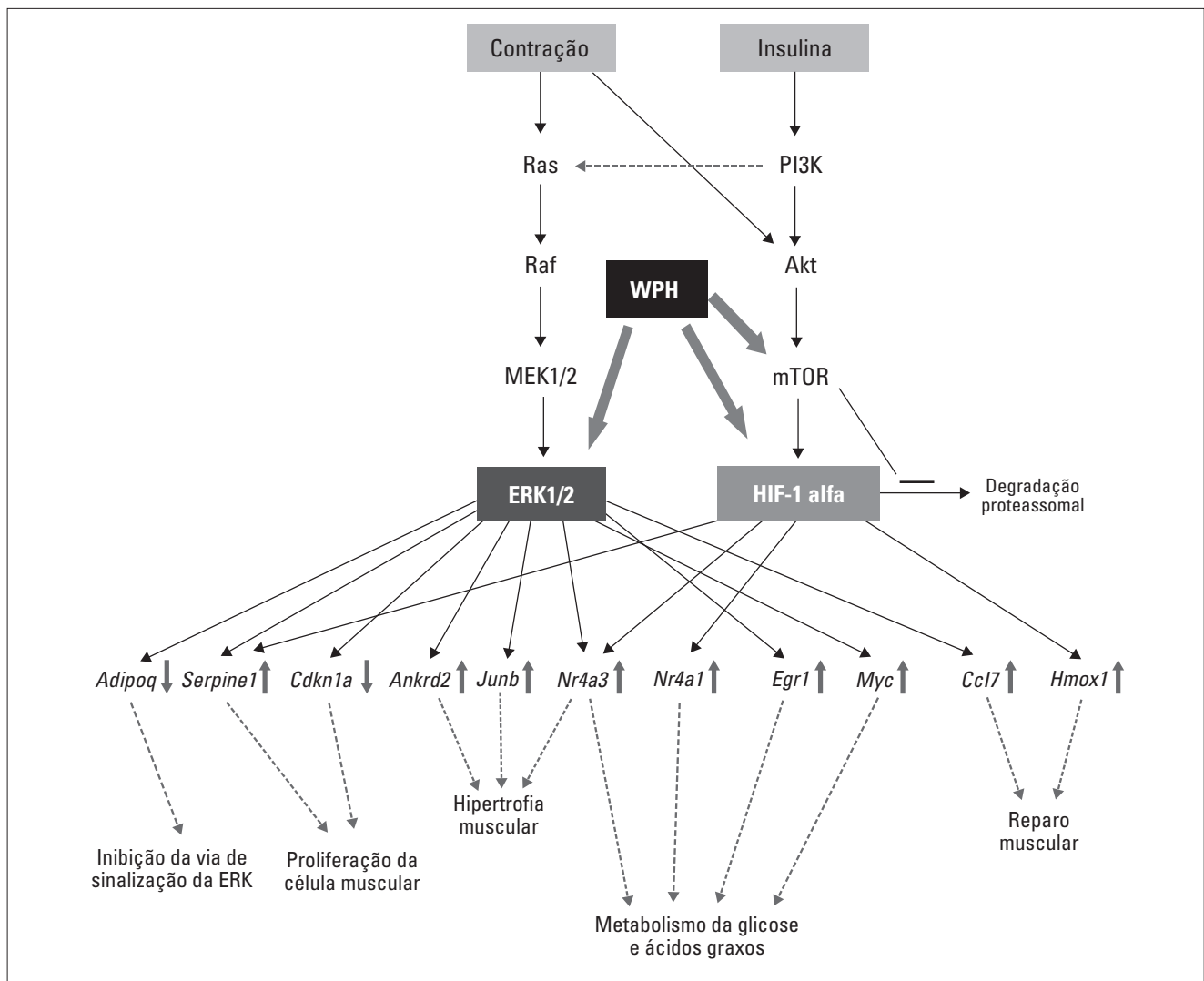



Figura 31.6 Possíveis vias de regulação da expressão gênica induzidas pela ingestão de proteína do soro do leite hidrolisada via proteína quinase regulada por sinais extracelulares 1/2 (ERK 1/2) e fator induzido pela hipóxia-1alfa (HIF-1alfa). Adipoq: adiponectina; Akt: proteína quinase B; Ankrd2: anquirina repetição de domínio contendo proteína 2; Ccl7: proteína quimiotática de monócitos 3 (MCP-3); Cdkn1a: inibidor de quinase dependente de ciclina 1A; Egr1: gene precoce de resposta ao crescimento 1; Hmox1: heme oxigenase-1; Junb: proto-oncogene Jun B; MEK1/2: proteína quinase quinase ativada por mitógenos; mTOR: proteína alvo da rapamicina em mamíferos; Myc: oncogene mielocitamatose; Nr4a1 e 3: subfamília 4 do receptor nuclear, grupo A, membros 1 e 3; PI3K: fosfatidil inositol 3 quinase; Raf: proteína quinase quinase quinase ativada por mitógenos (MAP3K); Ras: proteína ligadora de GTP com atividade GTPase intrínseca. **Fonte:** adaptada de Kanda et al.[158]

nóis (com representação de 75% pela quercetina) varia entre 13 e 64 mg/dia, dependendo da população estudada.[159]

A quercetina atua na redução da resposta inflamatória por meio da inibição *in vitro* da expressão dos genes que codificam as enzimas ciclo-oxigenase 2 (COX-2) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS), e pela diminuição da translocação do fator de transcrição NF-kB do citoplasma para o núcleo. A quercetina tem a capacidade de inibir as proteínas ERK e c-Jun NH_2-terminal quinase (JNK) e suas formas fosforiladas. Em macrófagos, a quercetina inibe a transcrição do fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) por meio da inibição da fosforilação e da ativação da JNK/SAPK, ao mesmo tempo em que bloqueia a síntese de TNF-alfa por meio da inibição da fosforilação da ERK 1/2 e da atividade da p38.[160,161]

A quercetina pode influenciar a biogênese mitocondrial induzida pelo exercício físico. Em um estudo no qual animais foram submetidos a exercícios físicos e suplementados com quercetina, verificou-se, a partir da análise do músculo sóleo, que essa intervenção nutricional resultou em aumento da expressão gênica do PGC-1alfa e da SIRT1. Aliado a esse fato, verificou-se que o conteúdo de DNA mitocondrial no tecido muscular aumentou em relação ao grupo placebo.[162] Tais efeitos oriundos da suplementação de quercetina podem ter implicações relevantes no aumento de desempenho físico ante o treinamento de resistência.

Glutamina

A glutamina é o aminoácido livre mais abundante no plasma e no tecido muscular, utilizada em altas taxas por células de divisão rápida, incluindo leucócitos, para fornecer energia e favorecer a biossíntese de nucleotídeos. Em relação ao metabolismo da glutamina em células do sistema imune, destaca-se o fato de linfócitos e macrófagos terem a capacidade de utilizar glutamina para obter energia, sendo precursores para a biossíntese de macromoléculas. Estudo envolvendo neutrófilos demonstrou que essas células também consomem glutamina ativamente, sendo a taxa de utilização de glutamina por neutrófilos, assim como por linfócitos e macrófagos, similar ou até mesmo superior quando comparada à de glicose.[163-165]

Estudos *in vivo* com humanos têm demonstrado que o exercício de alta intensidade e curta duração aumenta a concentração de glutamina no plasma. Constata-se, inicialmente, liberação acelerada desse aminoácido a partir da musculatura esquelética; consequentemente, há aumento da concentração plasmática de glutamina. Contudo, redução significativa da concentração plasmática de glutamina tem sido observada quando o exercício é prolongado e exaustivo.[166] Diante desse fato, pode-se questionar quais mecanismos acarretam a diminuição das

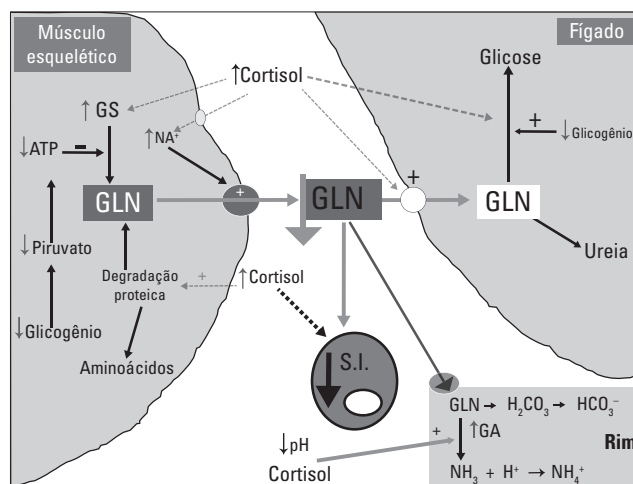



Figura 31.7 Mecanismos que acarretam a diminuição das concentrações de glutamina plasmática e muscular durante e após o exercício físico prolongado. ATP: adenosina trifosfato; GA: glutaminase; GLN: glutamina; GS: glutamina sintetase; H^+: íon hidrogênio; H_2CO_3: ácido carbônico; HCO_3^-: bicarbonato; Na^+: sódio; NH_3: amônia; NH_4^+: amônio; SI: sistema imune.

concentrações de glutamina plasmática e muscular durante e após o exercício físico prolongado. Dentre os possíveis mecanismos relacionados, observa-se que, durante esse tipo de exercício físico, ocorre o aumento da concentração do hormônio cortisol, que estimula tanto o efluxo de glutamina muscular quanto a captação desse aminoácido pelo fígado. Desse modo, a maior oferta de glutamina no fígado, aliada à diminuição dos estoques de glicogênio hepático e ao aumento da concentração de cortisol, promove maior estímulo da gliconeogênese hepática a partir desse aminoácido (Figura 31.7).[167,168]

Outro mecanismo implicado na diminuição da glutaminemia durante o exercício físico prolongado refere-se ao aumento da concentração de lactato sanguíneo, que altera o pH do sangue (acidose metabólica) e, consequentemente, acarreta maior captação de glutamina pelos rins. A eliminação de íons H^+ pelos rins envolve o fornecimento de amônia oriunda da glutamina, a qual escapa das células dos túbulos renais por um processo de difusão passiva e se une a prótons H^+, formando íons amônio (NH_4^+). A perda de íons hidrogênio auxilia na manutenção do equilíbrio ácido-base.[169,170] Além desses fatos, segundo MacKinnon e Hooper,[168] o aumento da captação de glutamina por células do sistema imune, principalmente quando ativadas, pode colaborar para a diminuição da concentração plasmática de glutamina induzida pelo exercício físico.

No que concerne aos efeitos da glutamina sobre a expressão gênica durante o exercício físico, verifica-se que esse aminoácido apresenta efeito protetor sobre a apoptose em neutrófilos induzida por uma única sessão de exercício. Nesse sentido, foi avaliado o efeito da suple-

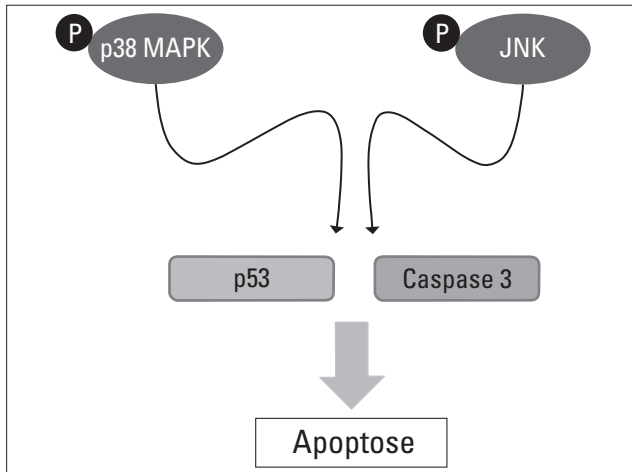



Figura 31.8 Quinases envolvidas no processo de apoptose celular, cuja ativação está relacionada com o aumento de atividade de mediadores apoptóticos clássicos, como p53 e caspase 3.

mentação oral de glutamina sobre a fosforilação das proteínas p38 MAPK e JNK, as quais estão envolvidas com o processo de apoptose celular, cuja ativação está relacionada com o aumento de atividade de mediadores apoptóticos clássicos, como p53 e caspase 3 (Figura 31.8). O estudo foi realizado com ratos, os quais foram suplementados com glutamina (1 g/kg), uma hora antes da realização de uma única sessão de exercício em esteira. O exercício físico promoveu, em neutrófilos peritoneais, aumento da fosforilação das proteínas p38 MAPK, JNK e da expressão das proteínas p53 e caspase 3. Contudo, a suplementação com glutamina parcialmente preveniu o aumento da fosforilação da p38 MAPK, da JNK e da expressão das proteínas p53, e aboliu completamente o aumento da expressão da caspase 3.[171] Desse modo, verifica-se que a apoptose em neutrófilos induzida por uma única sessão de exercício é acompanhada por um aumento da expressão de p53 e caspase 3 e da fosforilação da p38 MAPK e da JNK. A suplementação com glutamina previne esses efeitos e reduz a ocorrência de apoptose.

O exercício físico de alta intensidade ou de longa duração e exaustivo acarreta aumento da concentração plasmática de biomarcadores de lesão muscular, o que está relacionado ao aumento da produção de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio. Dentre os mecanismos antioxidantes celulares, destaca-se o tripeptídeo glutationa, que representa o mais importante antioxidante celular solúvel não enzimático. O aminoácido glutamato, que compõe esse tripeptídeo, é principalmente derivado do metabolismo da glutamina. Além disso, a glutamina modula a expressão de uma proteína com ação citoprotetora, a proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70), uma vez que esse aminoácido está envolvido com a ativação do fator de transcrição designado fator de choque térmico 1 (HSF-1), o que acarreta no aumento da transcrição da HSP70.[172-174] Nesse contexto, em um estudo realizado com animais que foram treinados em esteira durante 8 semanas (60 minutos por dia, 5 dias por semana) e suplementados com L-glutamina + L-alanina ou L-alanil-L-glutamina, verificou-se que ambas as suplementações promoveram aumento da concentração de glutationa e de glutamina nos músculos sóleo e gastrocnêmio durante os últimos 21 dias do protocolo experimental, bem como constatou-se que a suplementação com o dipeptídeo de glutamina aumentou a expressão proteica da HSP70 e do HSF-1 nos compartimentos citoplasmático e nuclear. A suplementação com os aminoácidos nas suas formas isoladas (L-glutamina + L-alanina) provocou aumento da expressão proteica da HSP70 nuclear e do HSF-1 no citoplasma e núcleo. No músculo gastrocnêmio, ambas as suplementações promoveram aumento da expressão proteica da HSP70 (citoplasma) e do HFS-1 (citoplasma e núcleo). Tais resultados sugerem que a glutamina melhora os mecanismos de defesa antioxidante que atenuam a concentração de biomarcadores de lesão muscular e, desse modo, aumenta os efeitos benéficos induzidos pelo treinamento físico de alta intensidade.[175]

Vitamina D

Humanos obtêm vitamina D por meio da alimentação, de suplementos alimentares e da exposição à luz solar. Em relação à alimentação, alguns alimentos contêm vitamina D naturalmente (salmão, sardinha, atum, óleo de fígado de bacalhau), enquanto outros podem ser fortificados com vitamina D (leite, iogurte, queijos, cereais matinais, suco de laranja). No tocante à exposição solar, estima-se que 80 a 90% da vitamina D no organismo seja proveniente da radiação ultravioleta B (comprimento de onda de 290 a 315 nm), a qual penetra na pele e converte o 7-deidrocolesterol em pré-vitamina D3, a qual é rapidamente convertida em vitamina D3. Esta é metabolizada no fígado em 25-hidroxivitamina D (25(OH)D) e, posteriormente, é metabolizada nos rins, em reação catalisada pela enzima 1alfa-hidroxilase (CYP27B1), para a sua forma ativa, a 1,25 di-hidroxivitamina D ($1,25(OH)_2D$), cuja síntese renal é finamente regulada pelos hormônios da glândula paratireoide e pelas concentrações séricas de cálcio e fósforo. A $1,25(OH)_2D$ também induz a expressão da enzima 24-hidroxilase (CYP24), a qual degrada tanto a 25(OH)D quanto a $1,25(OH)_2D$ em uma forma biologicamente inativa designada ácido calcitroico, o qual é excretado na bile.[176-178]

A forma ativa da vitamina D é um importante fator para a homeostase do cálcio e do metabolismo ósseo, atuando por meio da sua ligação ao receptor de vitamina

D (VDR), o qual pertence à superfamília de receptores nucleares. Aliado a esse fato, aventa-se a hipótese de que a vitamina D possa melhorar a força muscular por meio de um receptor nuclear altamente específico expresso nesse tecido. Tal fato foi avaliado em um estudo realizado com animais que foram distribuídos em três grupos: sedentário, exercício de alta intensidade e exercício de alta intensidade associado a suplementação de vitamina D. Os animais foram treinados em esteira (cinco dias por semana durante oito semanas). Ao final da última sessão de treinamento intenso, verificou-se que o exercício provocou aumento significativo da concentração plasmática de creatina quinase (CK) e de lactato desidrogenase, as quais são marcadores de lesão muscular. No tocante aos parâmetros de avaliação da expressão gênica no tecido muscular, o exercício acarretou aumento da expressão de TNF-alfa e de IL-6, bem como aumento da fosforilação da AMPK, da p38, da ERK1/2 e do inibidor de kappa B (IkB). Por outro lado, a suplementação de vitamina D reduziu a concentração plasmática de CK, a fosforilação da AMPK, da p38, da ERK1/2, da quinase do inibidor de kappa B (IKK) e do IkB e a expressão gênica de TNF-alfa e de IL-6, ao mesmo tempo em que promoveu aumento da expressão proteica do receptor de vitamina D.[179] Tais resultados indicam que a vitamina D apresenta papel relevante na lesão e na resposta pró-inflamatória induzidas pelo exercício físico intenso, por meio da modulação das vias de sinalização do NF-kB e da MAPK, com envolvimento do VDR.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A adaptação do organismo ao exercício físico é o resultado de alterações na expressão de genes mediadas não apenas pelo próprio exercício, mas por diferentes fatores, incluindo a interação entre exercícios, componentes da alimentação e variações genéticas. A expressão gênica é modificada de acordo com o tipo, a intensidade, a duração e a frequência do exercício físico, bem como é dependente do estado nutricional do indivíduo. Desse modo, conclui-se que estudos envolvendo expressão gênica e exercício físico devem considerar a alimentação ou qualquer tipo de suplementação nutricional como um possível fator de modulação dessa expressão gênica. Além disso, variações genéticas (polimorfismos de nucleotídeo único) apresentam influência relevante no desempenho físico. Considerando que a resposta a determinado protocolo de treinamento físico é frequentemente variável entre os indivíduos, deve-se atentar para o fato de que parte dessas variações é relacionada à constituição genética, à nutrição e às interações entre gene e ambiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Warden CH, Fisler JS. Gene-nutrient and gene-physical activity summary - genetics viewpoint. Obesity. 2008;16:S55-59.
2. Volek JS. Influence of nutrition on responses to resistance training. Med Sci Sports Exerc. 2004;36(4):689-96.
3. Heck AL, Barroso CS, Callie ME, Bray MS. Gene-nutrition interaction in human performance and exercise response. Nutrition. 2004;20(7-8):598-602.
4. Booth FW, Roberts CK, Laye MJ. Lack of exercise is a major cause of chronic diseases. Compr Physiol. 2012;2(2):1143-211.
5. Hallal PC, Andersen LB, Bull FC, Guthold R, Haskell W, Ekelund U et al. Global physical activity levels: surveillance progress, pitfalls, and prospects. Lancet. 2012;380(9838):247-57.
6. Colberg SR, Sigal RJ, Fernhall B, Rsteiner JG, Blissmer BJ, Rubin RR et al. Exercise and type 2 diabetes: the American College of Sports Medicine and the American Diabetes Association: joint position statement. Diabetes Care. 2010;33(12):e147-67.
7. Haskell WL, Lee IM, Pate RR, Powell KE, Blair SN, Franklin BA et al. Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. Med Sci Sports Exerc. 2007;39(8):1423-34.
8. O'Gorman DJ, Karlsson HK, McQuaid S, Yousif O, Rahman Y, Gasparro D et al. Exercise training increases insulin-stimulated glucose disposal and GLUT4 (SLC2A4) protein content in patients with type 2 diabetes. Diabetologia. 2006;49(12):2983-92.
9. Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA et al. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. N Engl J Med. 2002;346(6):393-403.
10. Borst SE. Interventions for sarcopenia and muscle weakness in older people. Age Ageing. 2004;33(6):548-55.
11. van Loon LJ, Greenhaff PL, Constantin-Teodosiu D, Saris WH, Wagenmakers AJ. The effects of increasing exercise intensity on muscle fuel utilisation in humans. J Physiol. 2001;536(Pt 1):295-304.
12. Jeukendrup AE, Jentjens R, Moseley L. Nutritional considerations in triathlon. Sports Med. 2005,35:163-181.
13. Tarnopolsky MA, Gibala M, Jeukendrup AE, Phillips SM. Nutritional needs of elite endurance athletes. Part I: Carbohydrate and fluid requirements. Eur J Sport Sci. 2005,5:3-14.
14. Romijn JA, Coyle EF, Sidossis LS, Gastaldelli A, Horowitz JF, Endert E et al. Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration. Am J Physiol. 1993;265(3 Pt 1):E380-91.
15. Coyle EF. Substrate utilization during exercise in active people. Am J Clin Nutr. 1995;61(4):968S-79S.
16. Coyle EF, Hagberg JM, Hurley BF, Martin WH, Ehsani AA, Holloszy JO. Carbohydrate feeding during prolonged strenuous exercise can delay fatigue. J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol. 1983;55(1 Pt 1):230-5.
17. Ahlborg G, Felig P, Hagenfeldt L, Hendler R, Wahren J. Substrate turnover during prolonged exercise in man. Splanchnic and leg metabolism of glucose, free fatty acids, and amino acids. J Clin Invest. 1974;53(4):1080-90.
18. Wahren J, Felig P, Ahlborg G, Jorfeldt L. Glucose metabolism during leg exercise in man. J Clin Invest. 1971;50(12):2715-25.
19. Birnbaum MJ. Identification of a novel gene encoding an insulin-responsive glucose transporter protein. Cell. 1989;57(2):305-15.

20. Charron MJ, Brosius FC 3rd, Alper SL, Lodish HF. A glucose transport protein expressed predominately in insulin-responsive tissues. Proc Natl Acad Sci USA. 1989;86(8):2535-9.
21. James DE, Strube M, Mueckler M. Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. Nature. 1989;338(6210):83-7.
22. Egan B; Zierath JR. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. Cell metabolism. 2013;17(2):162-184.
23. Booth FW, Lees SJ. Fundamental questions about genes, inactivity, and chronic diseases. Physiol Genomics. 2007;28(2):146-57.
24. Murton AJ, Greenhaff PL. Physiological control of muscle mass in humans during resistance exercise, disuse and rehabilitation. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2010;13(3):249-54.
25. Stephens NA, Gallagher IJ, Rooyackers O, Skipworth RJ, Tan BH, Marstrand T et al. Using transcriptomics to identify and validate novel biomarkers of human skeletal muscle cancer cachexia. Genome Med. 2010;2(1):1.
26. Timmons JA, Norrbom J, Scheele C, Thonberg H, Wahlestedt C, Tesch P. Expression profiling following local muscle inactivity in humans provides new perspective on diabetes-related genes. Genomics. 2006;87(1):165-72.
27. Jones SW, Hill RJ, Krasney PA, O'Conner B, Peirce N, Greenhaff PL. Disuse atrophy and exercise rehabilitation in humans profoundly affects the expression of genes associated with the regulation of skeletal muscle mass. Faseb J. 2004;18(9):1025-7.
28. Myers J, Prakash M, Froelicher V, Do D, Partington S, Atwood JE. Exercise capacity and mortality among men referred for exercise testing. N Engl J Med. 2002;346(11):793-801.
29. Lillioja S, Young AA, Culter CL, Ivy JL, Abbott WG, Zawadzki JK et al. Skeletal muscle capillary density and fiber type are possible determinants of in vivo insulin resistance in man. J Clin Invest. 1987;80(2):415-24.
30. Kriketos AD, Pan DA, Lillioja S, Cooney GJ, Baur LA, Milner MR et al. Inter-relationships between muscle morphology, insulin action, and adiposity. Am J Physiol. 1996;270(6 Pt 2):R1332-9.
31. Rung J, Cauchi S, Albrechtsen A, Shen L, Rocheleau G, Cavalcanti-Proenca C et al. Genetic variant near IRS1 is associated with type 2 diabetes, insulin resistance and hyperinsulinemia. Nat Genet. 2009;41(10):1110-15.
32. Slentz CA, Tanner CJ, Bateman LA, Durheim MT, Huffman KM, Houmard JA et al. Effects of exercise training intensity on pancreatic beta-cell function. Diabetes Care. 2009;32(10):1807-11.
33. Kraus WE, Houmard JA, Duscha BD, Knetzger KJ, Wharton MB, McCartney JS et al. Effects of the amount and intensity of exercise on plasma lipoproteins. N Engl J Med. 2002;347(19):1483-92.
34. Johnson JL, Slentz CA, Houmard JA, Samsa GP, Duscha BD, Aiken LB et al. Exercise training amount and intensity effects on metabolic syndrome (from Studies of a Targeted Risk Reduction Intervention through Defined Exercise). Am J Cardiol. 2007;100(12):1759-66.
35. Houmard JA, Tanner CJ, Slentz CA, Duscha BD, McCartney JS, Kraus WE. Effect of the volume and intensity of exercise training on insulin sensitivity. J Appl Physiol (1985). 2004;96(1):101-6.
36. Tuomilehto J, Lindstrom J, Eriksson JG, Valle TT, Hamalainen H, Ilanne-Parikka P et al. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. N Engl J Med. 2001;344(18):1343-50.
37. Goldberg RB, Temprosa M, Haffner S, Orchard TJ, Ratner RE, Fowler SE et al. Effect of progression from impaired glucose tolerance to diabetes on cardiovascular risk factors and its amelioration by lifestyle and metformin intervention: the Diabetes Prevention Program randomized trial by the Diabetes Prevention Program Research Group. Diabetes Care. 2009;32(4):726-32.
38. Uusitupa M, Peltonen M, Lindstrom J, Aunola S, Ilanne-Parikka P, Keinanen-Kiukaanniemi S et al. Ten-year mortality and cardiovascular morbidity in the Finnish Diabetes Prevention Study-secondary analysis of the randomized trial. PLoS One. 2009;4(5):e5656.
39. Burgomaster KA, Howarth KR, Phillips SM, Rakobowchuk M, MacDonald MJ, McGee SL et al. Similar metabolic adaptations during exercise after low volume sprint interval and traditional endurance training in humans. J Physiol. 2008;586(1):151-60.
40. Schjerve IE, Tyldum GA, Tjonna AE, Stolen T, Loennechen JP, Hansen HE et al. Both aerobic endurance and strength training programmes improve cardiovascular health in obese adults. Clin Sci (Lond). 2008;115(9):283-93.
41. Pollock ML, Franklin BA, Balady GJ, Chaitman BL, Fleg JL, Fletcher B et al. AHA Science Advisory. Resistance exercise in individuals with and without cardiovascular disease: benefits, rationale, safety, and prescription: An advisory from the Committee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention, Council on Clinical Cardiology, American Heart Association; Position paper endorsed by the American College of Sports Medicine. Circulation. 2000;101(7):828-33.
42. Chin ER. Role of Ca2+/calmodulin-dependent kinases in skeletal muscle plasticity. J Appl Physiol (1985). 2005;99(2):414-23.
43. Olson EN, Williams RS. Calcineurin signaling and muscle remodeling. Cell. 2000;101(7):689-92.
44. Chin ER, Olson EN, Richardson JA, Yang Q, Humphries C, Shelton JM et al. A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. Genes Dev. 1998;12(16):2499-509.
45. Pietilainen KH, Sysi-Aho M, Rissanen A, Seppanen-Laakso T, Yki-Jarvinen H, Kaprio J et al. Acquired obesity is associated with changes in the serum lipidomic profile independent of genetic effects – a monozygotic twin study. PLoS One. 2007;2(2):e218.
46. Palmer LJ, Jacobs KB, Elston RC. Haseman and Elston revisited: the effects of ascertainment and residual familial correlations on power to detect linkage. Genet Epidemiol. 2000;19(4):456-60.
47. Zhang SJ, Truskey GA, Kraus WE. Effect of cyclic stretch on beta1D-integrin expression and activation of FAK and RhoA. Am J Physiol Cell Physiol. 2007;292(6):C2057-69.
48. Tiainen KM, Perola M, Kovanen VM, Sipila S, Tuononen KA, Rikalainen K et al. Genetics of maximal walking speed and skeletal muscle characteristics in older women. Twin Res Hum Genet. 2008;11(3):321-34.
49. Isackson PJ, Bujnicki H, Harding CO, Vladuti GD. Myoadenylate deaminase deficiency caused by alternative splicing due to a novel intronic mutation in the AMPD1 gene. Mol Genet Metab. 2005;86(1-2):250-6.
50. Gonzalez NC, Kirkton SD, Howlett RA, Britton SL, Koch LG, Wagner HE et al. Continued divergence in VO_{2max} of rats artificially selected for running endurance is mediated by greater convective blood O_2 delivery. J Appl Physiol. 2006;101(5):1288-96.
51. Fujita S, Rasmussen BB, Cadenas JG, Drummond MJ, Glynn EL, Sattler FR et al. Aerobic exercise overcomes the age-related insulin resistance of muscle protein metabolism by improving endothelial function and Akt/mammalian target of rapamycin signaling. Diabetes. 2007;56(6):1615-22.
52. Chin ER, Grange RW, Viau F, Simard AR, Humphries C, Shelton J et al. Alterations in slow-twitch muscle phenotype in transge-

nic mice overexpressing the Ca2+ buffering protein parvalbumin. J Physiol. 2003;547(Pt 2):649-63.
53. Rose AJ, Kiens B, Richter EA. Ca2+-calmodulin-dependent protein kinase expression and signalling in skeletal muscle during exercise. J Physiol. 2006;574(Pt 3):889-903.
54. Wu H, Kanatous SB, Thurmond FA, Gallardo T, Isotani E, Bassel-Duby R et al. Regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by CaMK. Science. 2002;296(5566):349-52.
55. Liu Y, Randall WR, Schneider MF. Activity-dependent and -independent nuclear fluxes of HDAC4 mediated by different kinases in adult skeletal muscle. J Cell Biol. 2005;168(6):887-97.
56. McGee SL, Fairlie E, Garnham AP, Hargreaves M. Exercise-induced histone modifications in human skeletal muscle. J Physiol. 2009;587(Pt 24):5951-8.
57. Mahoney DJ, Parise G, Melov S, Safdar A, Tarnopolsky MA. Analysis of global mRNA expression in human skeletal muscle during recovery from endurance exercise. Faseb J. 2005;19(11):1498-500.
58. Timmons JA, Larsson O, Jansson E, Fischer H, Gustafsson T, Greenhaff PL et al. Human muscle gene expression responses to endurance training provide a novel perspective on Duchenne muscular dystrophy. Faseb J. 2005;19(7);750-60.
59. Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O et al. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. Nature. 2002;418(6899):797-801.
60. Jensen TE, Wojtaszewski JF, Richter EA. AMP-activated protein kinase in contraction regulation of skeletal muscle metabolism: necessary and/or sufficient? Acta Physiol (Oxf). 2009;196(1):155-74.
61. Norrbom J, Sundberg CJ, Ameln H, Kraus WE, Jansson E, Gustafsson T. PGC-1alpha mRNA expression is influenced by metabolic perturbation in exercising human skeletal muscle. J Appl Physiol (1985). 2004;96(1):189-94.
62. Gibala MJ, McGee SL, Garnham AP, Howlett KF, Snow RJ, Hargreaves M. Brief intense interval exercise activates AMPK and p38 MAPK signaling and increases the expression of PGC-1alpha in human skeletal muscle. J Appl Physiol (1985). 2009;106(3):929-34.
63. Akimoto T, Pohnert SC, Li P, Zhang M, Gumbs C, Rosenberg PB et al. Exercise stimulates Pgc-1alpha transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway. J Biol Chem. 2005;280(20):19587-93.
64. Widegren U, Jiang XJ, Krook A, Chibalin AV, Bjornholm M, Tally M et al. Divergent effects of exercise on metabolic and mitogenic signaling pathways in human skeletal muscle. Faseb J. 1998;12(13):1379-89.
65. Timmons JA, Wennmalm K, Larsson O, Walden TB, Lassmann T, Petrovic N et al. Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104(11):4401-6.
66. Handschin C, Spiegelman BM. The role of exercise and PGC1alpha in inflammation and chronic disease. Nature. 2008;454(7203):463-69.
67. Handschin C, Chin S, Li P, Liu F, Maratos-Flier E, Lebrasseur NK et al. Skeletal muscle fiber-type switching, exercise intolerance, and myopathy in PGC-1alpha muscle-specific knock-out animals. J Biol Chem. 2007;282(41):30014-21.
68. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J et al. PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. Nat Genet. 2003;34(3):267-73.
69. Gallagher IJ, Scheele C, Keller P, Nielsen AR, Remenyi J, Fischer CP, et al. Integration of microRNA changes in vivo identifies novel molecular features of muscle insulin resistance in type 2 diabetes. Genome Med. 2010;2(2):9.
70. Vollaard NB, Constantin-Teodosiu D, Fredriksson K, Rooyackers O, Jansson E, Greenhaff PL et al. Systematic analysis of adaptations in aerobic capacity and submaximal energy metabolism provides a unique insight into determinants of human aerobic performance. J Appl Physiol (1985). 2009;106(5):1479-86.
71. Keller P, Vollaard N, Babraj J, Ball D, Sewell DA, Timmons JA. Using systems biology to define the essential biological networks responsible for adaptation to endurance exercise training. Biochem Soc Trans. 2007;35(Pt 5):1306-9.
72. Leick L, Wojtaszewski JF, Johansen ST, Kiilerich K, Comes G, Hellsten Y et al. PGC-1alpha is not mandatory for exercise- and training-induced adaptive gene responses in mouse skeletal muscle. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2008;294(2):E463-74.
73. Norrbom J, Wallman SE, Gustafsson T, Rundqvist H, Jansson E, Sundberg CJ. Training response of mitochondrial transcription factors in human skeletal muscle. Acta Physiol (Oxf). 2010;198(1):71-9.
74. Bengtsson J, Gustafsson T, Widegren U, Jansson E, Sundberg CJ. Mitochondrial transcription factor A and respiratory complex IV increase in response to exercise training in humans. Pflugers Arch. 2001;443(1):61-6.
75. Timmons JA, Poucher SM, Constantin-Teodosiu D, Macdonald IA, Greenhaff PL. Metabolic responses from rest to steady state determine contractile function in ischemic skeletal muscle. Am J Physiol. 1997;273(2 Pt 1):E233-8.
76. Birk JB, Wojtaszewski JF. Predominant alpha2/beta2/gamma3 AMPK activation during exercise in human skeletal muscle. J Physiol. 2006;577(Pt 3):1021-32.
77. Costford SR, Kavaslar N, Ahituv N, Chaudhry SN, Schackwitz WS, Dent R et al. Gain-of-function R225W mutation in human AMPKgamma(3) causing increased glycogen and decreased triglyceride in skeletal muscle. PLoS One. 2007;2(9):e903.
78. Treebak JT, Birk JB, Rose AJ, Kiens B, Richter EA, Wojtaszewski JF. AS160 phosphorylation is associated with activation of alpha2 beta2 gamma1- but not alpha2 beta2 gamma3-AMPK trimeric complex in skeletal muscle during exercise in humans. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2007;292(3):E715-22.
79. McGee SL, Howlett KF, Starkie RL, Cameron-Smith D, Kemp BE, Hargreaves M. Exercise increases nuclear AMPK alpha2 in human skeletal muscle. Diabetes. 2003;52(4):926-8.
80. Treebak JT, Pehmoller C, Kristensen JM, Kjobsted R, Birk JB, Schjerling P et al. Acute exercise and physiological insulin induce distinct phosphorylation signatures on TBC1D1 and TBC1D4 proteins in human skeletal muscle. J Physiol. 2014;592(Pt 2):351-75.
81. Hutber CA, Hardie DG, Winder WW. Electrical stimulation inactivates muscle acetyl-CoA carboxylase and increases AMP-activated protein kinase. Am J Physiol. 1997;272(2 Pt 1):E262-6.
82. Merrill GF, Kurth EJ, Hardie DG, Winder WW. AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. Am J Physiol. 1997;273(6 Pt 1):E1107-12.
83. Vavvas D, Apazidis A, Saha AK, Gamble J, Patel A, Kemp BE et al. Contraction-induced changes in acetyl-CoA carboxylase and 5'-AMP-activated kinase in skeletal muscle. J Biol Chem. 1997; 272(20):13255-61.
84. Winder WW, Hardie DG. Inactivation of acetyl-CoA carboxylase and activation of AMP-activated protein kinase in muscle during exercise. Am J Physiol. 1996;270(2 Pt 1):E299-304.

85. O'Neill HM, Lally JS, Galic S, Thomas M, Azizi PD, Fullerton MD et al. AMPK phosphorylation of ACC2 is required for skeletal muscle fatty acid oxidation and insulin sensitivity in mice. Diabetologia. 2014;57(8):1693-702.
86. Mounier R et al. Expanding roles for AMPK in skeletal muscle plasticity. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2015;26(6):275-286.
87. Roepstorff C, Halberg N, Hillig T, Saha AK, Ruderman NB, Wojtaszewski JF et al. Malonyl-CoA and carnitine in regulation of fat oxidation in human skeletal muscle during exercise. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2005;288(1):E133-42.
88. Jeppesen J, Maarbjerg SJ, Jordy AB, Fritzen AM, Pehmoller C, Sylow L et al. LKB1 regulates lipid oxidation during exercise independently of AMPK. Diabetes. 2013;62(5):1490-9.
89. Miura S, Kai Y, Kamei Y, Bruce CR, Kubota N, Febbraio MA et al. Alpha2-AMPK activity is not essential for an increase in fatty acid oxidation during low-intensity exercise. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009;296(1):E47-55.
90. Dzamko N, Schertzer JD, Ryall JG, Steel R, Macaulay SL, Wee S, et al. AMPK-independent pathways regulate skeletal muscle fatty acid oxidation. J Physiol. 2008;586(Pt 23):5819-31.
91. Jeppesen J, Albers PH, Rose AJ, Birk JB, Schjerling P, Dzamko N et al. Contraction-induced skeletal muscle FAT/CD36 trafficking and FA uptake is AMPK independent. J Lipid Res. 2011;52(4):699-711.
92. O'Neill HM, Maarbjerg SJ, Crane JD, Jeppesen J, Jørgensen SB, Schertzer JD et al. AMP-activated protein kinase (AMPK) beta1 beta2 muscle null mice reveal an essential role for AMPK in maintaining mitochondrial content and glucose uptake during exercise. Proc Natl Acad Sci USA. 2011;108(38):16092-7.
93. Fentz J, Kjobsted R, Birk JB, Jordy AB, Jeppesen J, Thorsen K et al. AMPK alpha is critical for enhancing skeletal muscle fatty acid utilization during in vivo exercise in mice. Faseb J. 2015;29(5):1725-38.
94. Richter EA, Hargreaves M. Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake. Physiol Rev. 2013;93(3):993-1017.
95. Chadt A, Immisch A, de Wendt C, Springer C, Zhou Z, Stermann T et al. Deletion of both Rab-GTPase-activating proteins TBC1D1 and TBC1D4 in mice eliminates insulin- and AICAR-stimulated glucose transport [corrected]. Diabetes. 2015;64(3):746-59.
96. Stockli J, Meoli CC, Hoffman NJ, Fazakerley DJ, Pant H, Cleasby ME et al. The RabGAP TBC1D1 plays a central role in exercise-regulated glucose metabolism in skeletal muscle. Diabetes. 2015;64(6):1914-22.
97. Szekeres F, Chadt A, Tom RZ, Deshmukh AS, Chibalin AV, Bjornholm M et al. The Rab-GTPase-activating protein TBC1D1 regulates skeletal muscle glucose metabolism. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2012;303(4):E524-33.
98. Musi N, Fujii N, Hirshman MF, Ekberg I, Froberg S, Ljungqvist O et al. AMP-activated protein kinase (AMPK) is activated in muscle of subjects with type 2 diabetes during exercise. Diabetes. 2001;50(5):921-7.
99. McGee SL, Hargreaves M. AMPK-mediated regulation of transcription in skeletal muscle. Clin Sci (Lond). 2010;118(8):507-18.
100. McGee SL, Hargreaves M. Histone modifications and exercise adaptations. J Appl Physiol (1985). 2011;110(1):258-63.
101. Jager S, Handschin C, St-Pierre J, Spiegelman BM. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104(29):12017-22.
102. Canto C, Jiang LQ, Deshmukh AS, Mataki C, Coste A, Lagouge M et al. Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle. Cell Metab. 2010;11(3):213-9.
103. Pedersen BK, Febbraio MA. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. Nat Rev Endocrinol. 2012;8(8):457-65.
104. Carey AL, Steinberg GR, Macaulay SL, Thomas WG, Holmes AG, Ramm G et al. Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase. Diabetes. 2006;55(10):2688-97.
105. Gray SR, Kamolrat T. The effect of exercise induced cytokines on insulin stimulated glucose transport in C2C12 cells. Cytokine. 2011;55(2):221-8.
106. Huh JY, Mougios V, Kabasakalis A, Fatouros I, Siopi A, Douroudos II et al. Exercise-induced irisin secretion is independent of age or fitness level and increased irisin may directly modulate muscle metabolism through AMPK activation. J Clin Endocrinol Metab. 2014;99(11):E2154-61.
107. Shan T, Liang X, Bi P, Kuang S. Myostatin knockout drives browning of white adipose tissue through activating the AMPK--PGC1alpha-Fndc5 pathway in muscle. Faseb J. 2013;27(5):1981-9.
108. Glund S, Treebak JT, Long YC, Barres R, Viollet B, Wojtaszewski JF, Zierath JR. Role of adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase in interleukin-6 release from isolated mouse skeletal muscle. Endocrinology. 2009;150(2):600-6.
109. Lauritzen HP, Brandauer J, Schjerling P, Koh HJ, Treebak JT, Hirshman MF et al. Contraction and AICAR stimulate IL-6 vesicle depletion from skeletal muscle fibers in vivo. Diabetes. 2013;62(9):3081-92.
110. Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. Nat Cell Biol. 2001;3(11):1014-89.
111. Sandri M. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. Physiology (Bethesda). 2008;23:160-70.
112. Philp A, Hamilton DL, Baar K. Signals mediating skeletal muscle remodeling by resistance exercise: PI3-kinase independent activation of mTORC1. J Appl Physiol (1985). 2011;110(2):561-8.
113. Fang Y, Vilella-Bach M, Bachmann R, Flanigan A, Chen J. Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. Science. 2001;294(5548):1942-5.
114. O'Neil TK, Duffy LR, Frey JW, Hornberger TA. The role of phosphoinositide 3-kinase and phosphatidic acid in the regulation of mammalian target of rapamycin following eccentric contractions. J Physiol. 2009;587(Pt 14):3691-701.
115. Hornberger TA, Chu WK, Mak YW, Hsiung JW, Huang SA, Chien S. The role of phospholipase D and phosphatidic acid in the mechanical activation of mTOR signaling in skeletal muscle. Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103(12):4741-46.
116. Durieux AC, D'Antona G, Desplanches D, Freyssenet D, Klossner S, Bottinelli R et al. Focal adhesion kinase is a load-dependent governor of the slow contractile and oxidative muscle phenotype. J Physiol. 2009;587(Pt 14):3703-17.
117. Klossner S, Durieux AC, Freyssenet D, Flueck M. Mechano-transduction to muscle protein synthesis is modulated by FAK. Eur J Appl Physiol. 2009;106(3):389-98.
118. Wilkinson SB, Phillips SM, Atherton PJ, Patel R, Yarasheski KE, Tarnopolsky MA et al. Differential effects of resistance and endurance exercise in the fed state on signalling molecule phos-

phorylation and protein synthesis in human muscle. J Physiol. 2008;586(Pt 15):3701-17.
119. Terzis G, Georgiadis G, Stratakos G, Vogiatzis I, Kavouras S, Manta P et al. Resistance exercise-induced increase in muscle mass correlates with p70S6 kinase phosphorylation in human subjects. Eur J Appl Physiol. 2008;102(2):145-52.
120. Baar K, Esser K. Phosphorylation of p70(S6k) correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise. Am J Physiol. 1999;276(1 Pt 1):C120-7.
121. Rennie MJ, Wackerhage H, Spangenburg EE, Booth FW. Control of the size of the human muscle mass. Annu Rev Physiol. 2004;66:799-828.
122. Clarke BA, Drujan D, Willis MS, Murphy LO, Corpina RA, Burova E et al. The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. Cell Metab. 2007;6(5):376-85.
123. Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A et al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. Cell. 2004;117(3):399-412.
124. Louis E, Raue U, Yang Y, Jemiolo B, Trappe S. Time course of proteolytic, cytokine, and myostatin gene expression after acute exercise in human skeletal muscle. J Appl Physiol (1985). 2007;103(5):1744-51.
125. Coffey VG, Shield A, Canny BJ, Carey KA, Cameron-Smith D, Hawley JA. Interaction of contractile activity and training history on mRNA abundance in skeletal muscle from trained athletes. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2006;290(5):E849-55.
126. Hawley JA, Hargreaves M, Zierath JR. Signalling mechanisms in skeletal muscle: role in substrate selection and muscle adaptation. Essays Biochem. 2006;42:1-12.
127. Holloszy JO, Kohrt WM, Hansen PA. The regulation of carbohydrate and fat metabolism during and after exercise. Front Biosci. 1998;3:D1011-27.
128. Wood IS, Trayhurn P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. Br J Nutr. 2003;89:3-9.
129. Richter EA, Kristiansen S, Wojtaszewski JFP et al. Glucose transport and transporters in skeletal muscle. In: Hargreaves M, Thompson M. Biochemistry of exercise X. Champaign: Human Kinetics; 1998.
130. McGee SL, Hargreaves M. Exercise and skeletal muscle glucose transporter 4 expression: molecular mechanisms. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2006;33:395-9.
131. Wasserman DH, Halseth AE. An overview of muscle glucose uptake during exercise. Sites of regulation. Adv Exp Med Biol. 1998;441:1-16.
132. Cortright RN, Dohm GL. Mechanisms by which insulin and muscle contraction stimulate glucose transport. Can J Appl Physiol. 1997;22:519-30.
133. Harasim E, Kalinowska A, Chabowski A, Stepek T. The role of fatty-acid transport proteins (FAT/CD36, FABPpm, FATP) in lipid metabolism in skeletal muscles. Postepy Hig Med Dosw. 2008;62:433-41.
134. Bonen A, Campbell SE, Benton CR et al. Regulation of fatty acid transport by fatty acid translocase/CD36. Proc Nutr Soc. 2004;63:245-9.
135. Clarke SD, Baillie R, Jump DB, Nakamura MT. Fatty acid regulation of gene expression. Its role in fuel partitioning and insulin resistance. Ann N Y Acad Sci 1997;827:178-87.
136. Spellman CW. Achieving glycemic control: cornerstone in the treatment of patients with multiple metabolic risk factors. J Am Osteopath Assoc. 2009;109:S8-13.
137. Wood RJ, Fernandez ML. Carbohydrate-restricted versus low-glycemic-index diets for the treatment of insulin resistance and metabolic syndrome. Nutr Rev. 2009;67:179-83.
138. Siu PM, Wong SH. Use of the glycemic index: effects on feeding patterns and exercise performance. J Physiol Anthropol Appl Human Sci. 2004;23:1-6.
139. Kirwan JP, Cyr-Campbell D, Campbell WW, Scheiber J, Evans WJ. Effects of moderate and high glycemic index meals on metabolism and exercise performance. Metabolism. 2001;50:849-55.
140. Cheng IS, Liao SF, Liu KL et al. Effect of dietary glycemic index on substrate transporter gene expression in human skeletal muscle after exercise. Eur J Clin Nutr 2009;63:1404-10.
141. Helge JW, Stallknecht B, Pedersen BK, Galbo H, Kiens B, Richter EA. The effect of graded exercise on IL-6 release and glucose uptake in human skeletal muscle. J Physiol. 2003;546:299-305.
142. Pedersen BK, Hoffman-Goetz L. Exercise and the immune system: Regulation, integration and adaption. Physiol Rev. 2000;80: 1055-81.
143. Keller C, Keller P, Marshal S, Pedersen BK. IL-6 gene expression in human adipose tissue in response to exercise – effect of carbohydrate ingestion. J Physiol. 2003;550(Pt 3):927-31.
144. Boirie Y, Dangin M, Gachon P, Vasson MP, Maubois JL, Beaufrère B. Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. Proc Natl Acad Sci USA. 1997;94(26): 14930-5.
145. Tipton KD, Phillips SM. Dietary protein for muscle hypertrophy. Nestle Nutr Inst Workshop Ser. 2013;76:73-84.
146. Breen L, Phillips SM. Nutrient interaction for optimal protein anabolism in resistance exercise. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2012;15(3):226-32.
147. Phillips SM. Dietary protein requirements and adaptive advantages in athletes. Br J Nutr. 2012a;108(Suppl 2):S158-67.
148. Phillips SM. Nutrient-rich meat proteins in offsetting age-related muscle loss. Meat Sci. 2012;92(3):174-8.
149. Tipton KD, Elliott TA, Cree MG, Wolf SE, Sanford AP, Wolfe RR. Ingestion of casein and whey proteins result in muscle anabolism after resistance exercise. Med Sci Sports Exerc. 2004;36: 2073-81.
150. Burke DG, Chilibeck PD, Davidson KS, Candow DG, Farthing J, Smith-Palmer T. The effect of whey protein supplementation with and without creatine monohydrate combined with resistance training on lean tissue mass and muscle strength. Int J Sport Nutr Exerc Metab. 2011;11:349-64.
151. Yang W, Zhang Y, Li Y, Wu Z, Zhu D. Myostatin induces cyclin D1 degradation to cause cell cycle arrest through a phosphatidylinositol 3–kinase/AKT/GSK-3 beta pathway and is antagonized by insulin-like growth factor 1. J Biol Chem. 2007;282:3799-808.
152. Gonzalez-Cadavid NF, Bhasin S. Role of myostatin in metabolism. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2004;7:451-57.
153. McCroskery S, Thomas M, Maxwell L, Sharma M, Kambadur R. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. J Cell Biol. 2003;162:1135-47.
154. Taylor WE, Bhasin S, Artaza J et al. Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2001;280:E221-8.
155. Hulmi JJ, Kovanen V, Lisko I, Selänne H, Mero AA. The effects of whey protein on myostatin and cell cycle-related gene expres-

sion responses to a single heavy resistance exercise bout in trained older men. Eur J Appl Physiol. 2008;102:205-13.
156. Ivy JL, Goforth HW Jr, Damon BM et al. Earlypostexercise muscle glycogen recovery is enhanced with a carbohydrate–protein supplement. J Appl Physiol. 2002;93:1337-44.
157. Zawadzki KM, Yaspelkis BB 3rd, Ivy JL. Carbohydrate–protein complex increases the rate of muscle glycogen storage after exercise. J Appl Physiol. 1992;72:1854-9.
158. Kanda A, Ishijima T, Shinozaki F, Nakayama K, Fukasawa T, Nakai Y et al. Post-exercise impact of ingested whey protein hydrolysate on gene expression profiles in rat skeletal muscle: activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and hypoxia-inducible factor-1α Br J Nutr. 2014;111(12):2067-78.
159. Bastos DH, Rogero MM, Arêas JA. Effects of dietary bioactive compounds on obesity induced inflammation. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2009;53(5):646-56.
160. Aggarwal BB, Shishodia S. Molecular targets of dietary agent for prevention and therapy of cancer. Biochem Pharmacol. 2006;71(10):1397-421.
161. Rahman I, Biswas SK, Kirkham PA. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. Biochem Pharmacol. 2006;72(11):1439-52.
162. Davis JM, Murphy EA, Carmichael MD, Davis B. Quercetin increases brain and muscle mitochondrial biogenesis and exercise tolerance. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2009;296(4):R1071-7.
163. Lagranha CJ, Levada-Pires AC, Sellitti DF, Procopio J, Curi R, Pithon-Curi TC. The effect of glutamine supplementation and physical exercise on neutrophil function. Amino Acids. 2008;34:337-46.
164. Rogero MM, Tirapegui J, Vinolo MA et al. Dietary glutamine supplementation increases the activity of peritoneal macrophages and hemopoiesis in early-weaned mice inoculated with Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin. J Nutr. 2008;138:1343-8.
165. Curi R, Newsholme P, Procopio J, Lagranha C, Gorjão R, Pithon-Curi TC. Glutamine, gene expression, and cell function. Front Biosci. 2007;12:344-57.
166. Gleeson M. Dosing and efficacy of glutamine supplementation in human exercise and sport training. J Nutr. 2008;138:2045S-9S.
167. Bishop NC, Blannin AK, Walsh NP et al. Nutritional aspects of immunosupression in athletes. Sports Medicine. 1999;28:151-76.
168. MacKinnon LT, Hooper SL. Plasma glutamine and upper respiratory tract infection during intensified training in swimmers. Medicine and Science in Sports and Exercise. 1996;28:285-90.
169. Smith DJ, Norris SR. Changes in glutamine and glutamate concentrations for tracking training tolerance. Medicine and Science in Sports and Exercise. 2000;32:684-9.
170. Walsh NP, Blannin AK, Robson PJ et al. Glutamine, exercise and immune function: links and possible mechanisms. Sports Medicine. 1998;26:177-91.
171. Lagranha CJ, Hirabara SM, Curi R, Pithon-Curi TC. Glutamine supplementation prevents exercise-induced neutrophil apoptosis and reduces p38 MAPK and JNK phosphorylation and p53 and caspase 3 expression. Cell Biochem Funct. 2007;25(5):563-9.
172. Petry ER, Cruzat VF, Heck TG, Homem de Bittencourt PI Jr, Tirapegui J. L-glutamine supplementations enhance liver glutamine-glutathione axis and heat shock factor-1 expression in endurance-exercise trained rats. Int J Sport Nutr. 2015;25(2):188-97.
173. Cruzat VF, Tirapegui J. Effects of oral supplementation with glutamine and alanyl-glutamine on glutamine, glutamate, and glutathione status in trained rats and subjected to long-duration exercise. Nutrition. 2009;25(4):428-35.
174. Jing L, Wu Q, Wang F. Glutamine induces heat-shock protein and protects against Escherichia coli lipopolysaccharide-induced vascular hyporeactivity in rats. Crit Care. 2007;11(2):R34.
175. Petry ER, Cruzat VF, Heck TG, Leite JS, Homem de Bittencourt PI Jr, Tirapegui J. Alanyl-glutamine and glutamine plus alanine supplements improve skeletal redox status in trained rats: involvement of heat shock protein pathways. Life Sci. 2014;94(2):130-36.
176. Borges MC, Martini LA, Rogero MM. Current perspectives on vitamin D, immune system, and chronic diseases. Nutrition. 2011;27:399-404.
177. Holick MF. Vitamin D deficiency. N Engl J Med. 2007;357:266-81.
178. Lips P. Vitamin D physiology. Prog Biophys Mol Biol. 2006;92:4-8.
179. Choi M, Park H, Cho S, Lee M. Vitamin D3 supplementation modulates nflammatory responses from the muscle damage induced by high-intensity exercise in SD rats. Cytokine. 2013;63(1):27-35.

Influência da genética no desempenho físico e esportivo

32

Rodrigo Luiz Vancini
João Bosco Pesquero

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, grandes avanços no conhecimento da biologia humana têm acontecido por meio dos estudos genéticos, levando ao desenvolvimento de novos métodos preventivos e de estratégias terapêuticas e diagnósticas. Particularmente, as biologias celular e molecular têm papel relevante nesse cenário, sendo o estudo e a detecção de modificações gênicas as bases para o conhecimento de doenças complexas e que resultam de múltiplas interações genéticas e, às vezes, com forte influência ambiental, comportamental e do estilo de vida.[1] Por exemplo, o estado geral de saúde e o desempenho físico dependem da combinação e da interação de múltiplos fatores externos (ambiente) e internos (genética).[2-4]

As bases moleculares das variações fenotípicas do ser humano são o objetivo central da genômica e, juntamente com todas as áreas de investigação científica relacionadas à genética, estão empenhadas no chamado rastreamento de possíveis genes candidatos. Dessa forma, as bases genéticas relacionadas a diversos fenótipos encontrados nos seres humanos são um desafio para a ciência atual, uma vez que variações na sequência do ácido desoxirribonucleico (DNA) são abundantes e a heterogeneidade do DNA entre indivíduos está diretamente ligada ao estado de saúde e a diferentes comportamentos e estilos de vida, como a prática de atividade física e/ou esportiva. A heterogeneidade do DNA apresenta-se de diversas formas, incluindo variações nas cópias de partes do DNA, inversões, inserções, deleções e outros rearranjos complexos. Acredita-se que exista cerca de um milhão de inserções ou deleções no genoma humano, as quais podem afetar a função de diversos genes.[5]

Todas as variações nas características humanas (ou fenotípicas) resultam da interação entre o genótipo do indivíduo e os estímulos ambientais. A hereditariedade (H^2) é definida como a proporção da variação fenotípica em uma população atribuída à variação genética entre os indivíduos e, de forma simples, pode ser representada por:

$$H^2 = \text{variação (genótipo)}/\text{variação (fenótipo)}$$

Isso vale não apenas para os estados de saúde e doença, mas também se aplica aos fenótipos esportivos.[6-8] O genótipo representa toda a combinação dos genes herdados pelo organismo afetando o fenótipo, o qual é a manifestação das características anatômicas, bioquímicas, fisiológicas e comportamentais de um indivíduo.

Exceto para gêmeos idênticos, que são monozigóticos, a variação do genótipo pode acarretar diferentes características fenotípicas, como força muscular e massa corporal e, ainda, a maneira dessas características responderem ao treinamento físico.[8] Nesse sentido, verifica-se que a hereditariedade pode ser responsável em 25% pela quantidade de gordura corporal, em 20 a 40% pela aptidão muscular, em 10 a 25% pela aptidão cardiovascular e também pela capacidade de treinabilidade dos indivíduos.[9] Ademais, tem alto impacto sobre a estatura, sendo, por exemplo, um tópico de bastante interesse em esportes como o voleibol e o basquetebol, nos programas de detecção de talentos esportivos;[2] também tem impacto sobre a envergadura, o tamanho dos músculos, o tipo de fibra muscular, o tamanho do coração, o tamanho e o volume dos pulmões, a frequência cardíaca de repouso, a força muscular e a flexibilidade. Além disso, a hereditariedade tem impacto moderado a alto sobre a resistência muscular e a capacidade aeróbia; impacto moderado sobre a pressão arterial, o fluxo aéreo pulmonar, a velocidade e potência anaeróbias; impacto pequeno a moderado sobre o perímetro da cintura, a atividade das enzimas utilizadas

na produção de energia, o tempo de reação e a precisão dos movimentos; e, ainda, baixo impacto sobre o equilíbrio e a densidade mitocondrial.[8]

O efeito dos genes na estrutura (morfologia) muscular é grande, como nas proteínas contráteis e na hipertrofia muscular, mas o mesmo não ocorre em relação à função (fisiologia).[8] É importante considerar que, quanto mais alto for o impacto da genética sobre uma determinada característica, menor será a influência dos fatores externos (p. ex., treinamento físico) sobre ela. As evidências de que um componente genético influencia o desempenho físico e esportivo são crescentes, e já foi demonstrado e identificado que mais de cem variantes genéticas podem contribuir para diferenças na aptidão física.[3,10]

A hereditariedade também tem papel importante nas variações individuais relacionadas com o aprendizado e o desempenho físico, uma vez que se podem observar diferentes níveis de melhora do desempenho mediante um mesmo estímulo de treinamento.[11] A genética, o ambiente e a interação entre ambos têm impacto importante sobre o desempenho físico, uma vez que variações no genótipo e no treinamento contribuem para as diferenças observadas em relação ao sucesso esportivo.[12] Também observa-se a existência de indivíduos que se adaptam bem ao estímulo do exercício físico e ao treinamento (indivíduos responsivos) e aqueles que não se adaptam ao exercício ou a um tipo específico de atividade (não responsivos), ou, ainda, aqueles que, mesmo treinando, melhoram pouco seu condicionamento físico (indivíduos pouco responsivos).[8,9]

Diferentes níveis de responsividade ao treinamento também estão relacionados à idade, à etnia, ao gênero, aos valores iniciais de consumo máximo de oxigênio (VO_2máx) e à força muscular. Os genes também têm grande efeito sobre o VO_2máx, a resistência cardiovascular, a frequência cardíaca máxima e a ventilação voluntária máxima. No entanto, a resistência cardiovascular é mais intensamente afetada pelos genes do que o VO_2máx, provavelmente porque muitas variáveis fisiológicas e bioquímicas estão envolvidas no exercício predominantemente de resistência aeróbia e os genes podem afetar cada uma delas.[9]

Portanto, o objetivo deste capítulo é apresentar algumas informações sobre a interação entre a genética, o ambiente e o desempenho físico e/ou esportivo.

ATINGINDO A EXCELÊNCIA NO ESPORTE

Para um indivíduo atingir nível de excelência e se tornar perito em qualquer tipo de atividade, seja ela esportiva ou não, deve possuir algumas características que o diferenciem das demais pessoas, como o alto conhecimento específico e a habilidade sobre a tarefa que pratica; armazenar e acessar informações de forma mais rápida e eficiente; e tomar decisões apropriadas e precisas em um curto espaço de tempo.[13]

Evidências observadas em esportes que necessitam de habilidades cognitivas e de percepção, quando se comparam sujeitos peritos e não peritos, demonstraram que os primeiros distinguem-se em domínios específicos e nas habilidades de processar informações; porém, essas diferenças de habilidade estão mais relacionadas com treinamento intenso do que com habilidades inatas, uma vez que o refinamento desses traços só é atingido após anos de treinamento ininterrupto e intensivo. Além disso, o estado de aprendizado ocorre rapidamente no início da prática, mas diminui ao longo do tempo, na medida em que a prática se torna sistemática.[11] Ericsson et al.[14] ressaltaram que não é simplesmente o fato de acumular horas de treinamento que conduzirá os sujeitos a níveis superiores de desempenho; a qualidade do treinamento também é importante. Para se atingir a excelência, é preciso criar oportunidades para prevenir platôs de aprendizagem e perpetuar as adaptações, aumentando-se a quantidade e a qualidade do treinamento, bem como intensificar continuamente as dificuldades das tarefas praticadas.[11]

De acordo com a teoria da prática deliberada proposta por Ericsson et al.,[14] altos níveis de treinamento são o requisito mínimo para alcançar níveis de perícia em uma determinada tarefa. Esse regime de treinamento intenso e ininterrupto que conduz à perícia tem sido verificado na música,[14] na matemática[15] e no esporte.[16,17] Essa teoria preconiza que não é o treinamento simples, realizado de qualquer forma, mas o treinamento programado, com altos níveis de motivação, atenção e esforço, que favorecerá o desempenho de alto nível. O modelo proposto por Ericsson et al.[18] sustenta que é preciso treinar muitas horas com muita concentração e intensidade, ou seja, ter mais de 10 mil horas acumuladas ao longo de pelo menos 10 anos,[19] para se atingir o nível de excelência e perícia em qualquer atividade, pois a prática constante e sistemática pode ativar genes inativos presentes no DNA de todos os indivíduos saudáveis. É interessante destacar que Druzhevskaya et al.[20] propõem uma hierarquização (Quadro 32.1) quanto ao nível de excelência atingido na prática esportiva.

No entanto, é preciso levar em consideração a particularidade biológica dos indivíduos e as especificidades de cada modalidade esportiva, conforme pode ser observado nos estudos que avaliaram a detecção de talentos esportivos em modalidades como hóquei, basquete, tênis e ginástica artística,[19,21] uma vez que cada indivíduo tem um "limiar" para executar determinado tipo de exercício físico e atingirá determinado nível, o que dependerá da natureza e do grau de dificuldade da tarefa e da interação de múltiplos fatores ambientais e genéticos.[22]

Quadro 32.1 Níveis de desempenho físico e esportivo

Nível	Descrição
Alta elite	Vencedores de campeonatos mundiais, copas do mundo e jogos olímpicos
Elite	Medalhistas de prata ou bronze de campeonatos mundiais, copas do mundo e jogos olímpicos ou ganhores de campeonatos nacionais e continentais
Subelite	Qualificados e participantes de competições internacionais e mundiais
Recreacionais	Competidores regionais com não mais que quatro anos de experiência no esporte
Controles	Voluntários saudáveis

INTERAÇÃO DA GENÉTICA COM O DESEMPENHO ESPORTIVO

O desempenho esportivo de alto nível requer a combinação integrada de múltiplos fatores internos, como a genética privilegiada e a idade cronológica, e fatores externos, como: o ambiente; a nutrição e o treinamento físico adequados; a participação em competições; os aspectos socioculturais e econômicos; a motivação; o gerenciamento da carreira; e o suporte científico.[2-4] Alguns desses fatores são treináveis (fisiológicos, psicológicos e biomecânicos), alguns ensinados (táticos) e outros estão fora do controle dos atletas e dos técnicos (genéticos e idade cronológica). No entanto, sugere-se atualmente que o fator determinante do potencial atlético sejam os "dotes" genéticos, o que inclui características antropométricas, cardiovasculares, composição de fibras musculares e capacidade de adaptação ao treinamento físico.[23] Em geral, há duas categorias de atletas de alto nível: os geneticamente talentosos e os que treinam arduamente.

Uma vasta gama de fenótipos humanos – por exemplo, a força muscular, a estrutura óssea, a elasticidade dos tendões e o tamanho do coração e pulmão – influencia o desempenho esportivo, cada um sendo o resultado de uma complexa interação entre sistemas anatômicos, bioquímicos e fisiológicos.[23] Por sua vez, cada um desses fenótipos será influenciado por um grande número de genes, ou seja, quanto mais amplo o fenótipo, maior o número de genes relevantes no processo.[6] A maioria desses genótipos preferíveis e favoráveis à prática esportiva não é muito comum, e sua combinação é ainda mais rara[2]. Em teoria, as chances de um indivíduo ter um genótipo esportivo perfeito são muito mais baixas que 1 em 20 milhões, ou seja, conforme ocorre o aumento do número de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNP, *single nucleotide polymorphism*) associados, a probabilidade diminui proporcionalmente.[3,6] Como a constituição física de um indivíduo pode ser limitada por seu genótipo, pode-se dizer que as variações genéticas individuais determinam o máximo de desempenho físico que uma pessoa alcançará.

A quantidade de indivíduos que tentam se tornar atletas de elite e aqueles que efetivamente atingem tal nível demonstra a importância de se conhecer os fatores, ambientais e/ou genéticos, que podem definir o desempenho de alto nível.[24] É interessante notar que já foram descritos inúmeros SNP que poderiam determinar o desempenho físico e esportivo, como da resistência cardiorrespiratória, da força muscular, dos traços de desempenho muscular, da intolerância ao exercício físico e da condição de pertencer à elite esportiva nacional ou mundial.[10,25]

Considerando os atletas de elite de nível mundial, verifica-se que, com a progressiva evolução tecnológica e científica, está cada vez mais difícil encontrar indivíduos que tenham potencial para atingir tal nível. Isso acontece principalmente porque, para tal, é necessário superar não somente adversários, mas também os limites do corpo humano. Além disso, para obter êxito nessa árdua tarefa, é necessária uma infraestrutura moderna e especializada, assim como profissionais altamente especializados trabalhando em regime multi e interdisciplinar.[26]

Os cientistas do esporte há tempos vêm estudando indivíduos com níveis excepcionais de desempenho físico e esportivo a partir de análises morfológicas e funcionais, que envolvem técnicas histoquímicas, dosagens bioquímicas e análises de parâmetros físicos e fisiológicos. Até o momento em que diversos grupos de pesquisa começaram a investigar a relação entre exercício físico, performance, perfil de expressão gênica e constituição genética acreditava-se que os níveis excepcionais de desempenho dos atletas de elite eram decorrentes exclusivamente do treinamento e do acompanhamento nutricional. No entanto, tais fatores têm se mostrado, ao longo do tempo, insuficientes para caracterizar os fenótipos associados ao sucesso esportivo.[23] Nesse sentido, a investigação genética vem se destacando na busca de respostas para a complexa problemática que é a detecção de talentos esportivos, pois auxilia na identificação de genes envolvidos no desempenho atlético, revelando não apenas a possibilidade de utilizá-los na descoberta de novos talentos,[3,6] mas também no desenvolvimento de técnicas de treinamento mais específicas e na prevenção de lesões decorrentes de sobrecargas excessivas de treinamento físico, para que dessa forma seja possível evitar quadros de *overtraining* – que é decorrente do excesso de treinamento –, o que poderia culminar com o abandono ou prejuízo da prática esportiva.

BIOLOGIA MOLECULAR, DESEMPENHO ESPORTIVO E GENES CANDIDATOS

Durante o exercício físico, as condições intrínsecas dos músculos em atividade mudam drasticamente em comparação com as condições de repouso. Essas mudan-

ças ativam cascatas de sinalização celular, processos pelos quais uma única molécula pode gerar múltiplas moléculas intracelulares efetoras, dentro das fibras musculares, com o objetivo principal de suprir a demanda energética do organismo.[27,28]

Muitos desses sinais celulares acionados nos músculos em atividade influenciam a transcrição gênica.[29,30] Dentre as mudanças dos meios intrínseco e extrínseco, às quais o músculo esquelético está sujeito durante e após o exercício físico, têm-se as alterações neurais, as mecânicas, as metabólicas, as hormonais, as condições de hipóxia e as mudanças de temperatura. Os efeitos dessas mudanças durante e após o exercício físico ocorrem por meio da ativação de proteínas quinases regulatórias que adicionam grupos fosfatos a um substrato e a fatores de crescimento.[31]

A resposta molecular a mudanças ambientais não se resume à indução de uma molécula sinalizadora ou de um fator de transcrição, mas, até certo ponto, inclui a estabilização e a degradação mais lenta de compostos que costumam ser degradados rapidamente. O resultado é uma maior capacidade de influenciar a transcrição gênica[29] e de provocar alterações estruturais e funcionais no organismo.

Um fator relevante ao se investigar a resposta ao treinamento em atletas de elite especialistas em provas de resistência aeróbia, por exemplo, é que o processo de ativação celular das moléculas sinalizadoras e dos fatores de crescimento é dependente da intensidade do exercício físico.[32] Além disso, várias dessas moléculas sinalizadoras podem ter diferentes isoformas que são influenciadas de maneira independente e específica em resposta a diferentes estímulos de treinamento.[33] Portanto, o princípio da especificidade do treinamento é válido também em nível celular e molecular.[29]

O entendimento da sinalização celular em nível muscular poderá auxiliar os cientistas do esporte a entender os fatores que conduzem um atleta ao sucesso esportivo. Estudos recentes em indivíduos fisicamente ativos demonstraram que o pico de transcrição de determinados genes ocorre precocemente após apenas cinco dias de treinamento consecutivo.[34] Além disso, indivíduos treinados em resistência aeróbia têm níveis elevados de RNA mensageiro, responsável pela síntese proteica, o que está relacionado com a capacidade oxidativa muscular.[35]

Evidências mostram que um grande número de genes tem associação com fenótipos do desempenho físico e da condição de saúde. Os fenótipos de desempenho físico, para os quais existe uma base genética, incluem a capacidade de resistência e de força muscular, o desempenho muscular, os determinantes da estrutura ligamentar e tendinosa e a aptidão e a postura emocional para os treinamentos.[36] No entanto, é preciso ter em mente que, com milhões de SNP de interesse no genoma humano, os pesquisadores são frequentemente obrigados a priorizar um SNP, especialmente na fase exploratória de um estudo genético. Portanto, nas Tabelas 32.1 a 32.3, estão apresentados resumos das variantes genéticas responsáveis pelo rendimento nas atividades predominantemente de resistência; aquelas relacionadas ao desempenho muscular e ao rendimento nas atividades predominantemente de potência e força; e, por fim, as variantes associadas com o risco de tendinopatias e com a atitude e o perfil psicológico, respectivamente.

Nesse contexto, serão abordados de forma mais aprofundada alguns genes candidatos relacionados ao desempenho esportivo de alto nível. Está bem estabelecido que o sistema renina-angiotensina-aldosterona desempenha papel relevante na homeostase dos fluidos corporais, sendo a enzima conversora de angiotensina I (ECA) componente central desse mecanismo.[38] A ECA é responsável pela degradação de cininas vasodilatadoras, promovendo a formação do agente vasoconstritor angiotensina II e degradando o peptídeo vasodilatador bradicinina. A angiotensina II estimula a liberação de aldosterona, o que conduz à retenção de sódio e água, influenciando o volume e a pressão sanguíneos.[39] Além disso, a ECA também é responsável pela regulação das reações inflamatórias, do estímulo respiratório, da eritropoiese, da oxigenação tecidual e da regulação da eficiência muscular.[40]

Algumas evidências mais contundentes sobre a influência dos fatores genéticos sobre o desempenho físico e esportivo são decorrentes da pesquisa sobre os genes da ECA e da alfa-actinina-3 (ACTN3).[3,41-44] No que se refere ao gene da ECA, este é amplamente expresso nos tecidos, incluindo o músculo esquelético, e pode desempenhar papel metabólico importante durante o exercício físico.[45] Ademais, a angiotensina II tem efeitos já conhecidos no metabolismo muscular,[46] como um fator de crescimento necessário para a hipertrofia do músculo esquelético em resposta à carga mecânica.[47]

Um SNP funcional no gene da ECA humana foi identificado, no qual a presença (inserção – alelo I) ou ausência (deleção – alelo D) de 287 pares de bases (pb) de um elemento repetitivo *Alu* no íntron 16 é associado a menor (I) ou maior (D) atividade enzimática da ECA[48,49] e diferentes combinações desses dois alelos resultam em três genótipos, II, ID e DD. É importante destacar que a frequência desses três genótipos varia bastante de acordo com a etnia. Indivíduos homozigotos para inserção (II) do gene da ECA apresentam menor atividade enzimática, o que pode favorecer a prática de esportes de resistência aeróbia, em razão da melhora da função cardiovascular[44,50] e da eficiência muscular,[51,52] sendo a responsividade da

Tabela 32.1 Genes envolvidos no rendimento das atividades de resistência cardiorrespiratória

Gene	Função biológica	Variação	Identificação do polimorfismo
ECA	Regulação da pressão sanguínea, desempenho muscular e concentrações de lipídios e glicose	I/D	N/D ACE InDel
BDKRB2	Eficiência metabólica muscular	-9/+9bp	N/D BDKRB2
NOS3	Vasodilatação e suprimento de oxigênio aos tecidos	G894 → T	rs1799983
HIF-1alfa	Angiogênese e eritropoiese, suprimento de oxigênio aos tecidos, taxa metabólica basal e taxa de recuperação fisiológica	C → T (P582 → S)	rs1799983
VEGF	Suprimento de oxigênio aos tecidos e angiogênese	A-2578 → C	rs699947
		G-1154 → A	rs1570360
		G-634 → C	rs2010963
EPOR	Proliferação e diferenciação de eritroblastos e suprimento de oxigênio aos tecidos	G6002 → A (Try439 → Stop)	N/D EPOR
HBB	Adaptação cardiorrespiratória ao treinamento	C16 → G C551 → T	rs12788013 rs11036351
CHRM2	Recuperação da frequência cardíaca	A616 → G	rs324640
PGC-1alfa	Geração de energia	G → A (G482 → S)	rs8192678
PPARdelta	Metabolismo de lipídios e carboidratos	A294 → G	rs2016520
CK-MM	Consumo de energia pelos músculos	Restrição NcoI A214 → G	rs1803285
ACTN3	Contração muscular rápida	C → T (R577 → X)	rs1815739
NRF2	Controle da expressão basal e induzida da resposta antioxidante, regulação da fisiologia e fisiopatologia da exposição a oxidantes	–	–
GYS1	Catálise da adição de monômeros de glicose na formação da molécula de glicogênio por meio de ligações alfa-1,4-glicosídeo, participação na síntese da enzima glicogênio sintase muscular	–	–
ADRbeta2	Regulação da função e responsividade da musculatura e função respiratórias	–	–

ACE InDel: enzima conversora de angiotensina I – inserção/deleção; *ACTN3*: gene da proteína alfa actinina-3; *ADRbeta2*: gene do receptor adrenérgico do subtipo beta-2; *BDKRB2*: gene do receptor de bradicinina do subtipo B2; *CHRM2*: gene do receptor colinérgico muscarínico do subtipo 2; *CK-MM*: gene da enzima creatina quinase muscular; *ECA*: gene da enzima conversora de angiotensina; *EPOR*: gene do receptor de eritropoietina; *GYS1*: gene da enzima glicogênio sintase; *HBB*: gene da hemoglobina; *HIF-1alfa*: gene do fator indutor de hipóxia 1-alfa; I/D: inserção/deleção; N/D: não disponível; *NOS3*: gene da enzima óxido nítrico sintase 3; *NRF2*: gene do fator nuclear eritroide 2; *PGC-1alfa*: gene do receptor ativado por proliferadores de peroxissomos do subtipo gama coativador 1-alfa; *PPARdelta*: gene do receptor ativado por proliferadores de peroxissomos do subtipo delta; rs: número de referência do polimorfismo; *VEGF*: gene do fator de crescimento endotelial vascular. **Fonte:** adaptada de Kambouris et al.[37] e Lippi et al.[36]

aptidão aeróbia refletida pelo VO_2máx, o qual é determinado pelo gene *ASSL1* e influenciado por 21 SNP.[2]

Já indivíduos homozigotos para deleção (DD) têm aumento da atividade da ECA, com consequente aumento da angiotensina II, um fator de crescimento muscular que pode ser benéfico em esportes relacionados à força e à potência musculares,[3,45] para as quais a contribuição da hereditariedade pode variar de 46 a 84%.[2] Além disso, curiosamente, o alelo I também tem sido relacionado com a tolerância à altitude, tornando-se um gene candidato ideal para ser estudado em atletas que residem em altitudes elevadas, dada a possibilidade de que o treinamento regular em condições de hipóxia poderia, parcialmente, explicar o sucesso esportivo em provas de resistência aeróbia.[10,53,54]

A evidência de que o alelo I está associado com o desempenho em atividade de resistência aeróbia é proveniente da observação da alta frequência desse alelo em corredores de elite de longas distâncias,[3,39] bem como em remadores.[55] Os achados que podem confirmar essas evidências referem-se à associação encontrada entre o alelo I e o desempenho de atividades de resistência aeróbia em atletas olímpicos, uma vez que a sua frequência foi maior conforme aumentou a distância das provas, sendo, respectivamente, de 0,35, 0,53 e 0,62 para distâncias meno-

Tabela 32.2 Genes associados com desempenho muscular e rendimento nas atividades de potência e força

Gene	Função biológica	Variação	Identificação do polimorfismo
ECA	Regulação da pressão sanguínea, desempenho muscular e concentrações de lipídios e glicose	I/D	N/D ACE InDel
NOS3	Vasodilatação e suprimento de oxigênio aos tecidos	G894 → T	rs1799983
HIF-1alfa	Angiogênese e eritropoiese, suprimento de oxigênio aos tecidos, taxa metabólica basal e taxa de recuperação fisiológica	C → T (P582 → S)	rs11549465
ACTN3	Contração muscular rápida	C → T (R577 → X)	rs1815739
AMPD1	Desempenho muscular	G34 → A	rs17602729
DIO1	Regulação do hormônio da tireoide e força muscular	C785 → T	rs11206244
MCT-1	Depuração do ácido lático e fadiga muscular	A1470 → T	rs1049434
CK-MM	Consumo de energia pelos músculos	–	–
MLCK	Participação na contração do músculo liso por meio da fosforilação, regulação da interação actina-miosina, participação na resposta inflamatória	–	–
IGF-1	Crescimento e reprodução celular, regulação do crescimento muscular, participação na síntese de proteínas	–	–

ACE InDel: enzima conversora de angiotensina I – inserção/deleção; *ACTN3*: gene da proteína alfa actinina-3; *AMPD1*: gene da adenosina monofosfato deaminase 1; *CK-MM*: gene da enzima creatina quinase muscular; *DIO1*: gene da iodotironina deiodinase tipo 1; *ECA*: gene da enzima conversora de angiotensina; *HIF-1alfa*: gene do fator indutor de hipóxia 1-alfa; I/D: inserção/deleção; *IGF-1*: gene do fator de crescimento semelhante à insulina; *MCT-1*: gene do transportador de monocarboxilato tipo 1; *MLCK*: gene da cadeia leve de miosina; N/D: não disponível; *NOS3*: gene da enzima óxido nítrico sintase 3; rs: número de referência do polimorfismo. **Fonte:** adaptada de Kambouris et al.[37] e Lippi et al.[36]

Tabela 32.3 Genes associados ao risco de lesão (tendinopatias) e com a atitude e o perfil psicológico

Gene	Função biológica	Variação	Identificação do polimorfismo
	Risco de lesão		
COL1alfa1	Formação de colágeno na cartilagem, osso, pele e tecido conectivo	G2046 → T	rs1800012
COL5alfa1	Formação de colágeno na cartilagem, osso, pele e tecido conectivo	C401→ T	rs12722
MMP3	Colágeno: degradação de tecido conectivo em reparo de lesão	A301→ G	rs679620
Grupo sanguíneo ABO			
TNC			
	Atitude e perfil psicológico		
5HTT			
BDNF			
UCP2			

5HTT: gene da proteína transportadora de serotonina; *BDNF*: gene do fator neurotrófico derivado do cérebro; *COL1alfa1*: gene da proteína do colágeno tipo 1 subtipo alfa-1; *COL5alfa1*: gene da proteína do colágeno tipo 5 subtipo alfa-1; *MMP3*: gene da proteína metalopeptidase da matriz 3; rs: número de referência do polimorfismo; *TNC*: gene da proteína tenascina C; UCP2: proteína desacopladora 2. **Fonte:** adaptada de Kambouris et al.[37]

res que 200 metros, de 400 a 3.000 metros e maiores que 5.000 metros.[39] O benefício proporcionado pelo alelo I no desempenho das atividades de resistência aeróbia pode envolver alterações genótipo-dependentes na resposta cardiorrespiratória ao treinamento.[56] Por outro lado, existem evidências que sugerem que o alelo D esteja associado com o desempenho atlético em atividades que exigem força e potência muscular. Myerson et al.[39] verificaram frequência aumentada do alelo D em velocistas de distâncias menores que 200 metros, bem como em nadadores de elite de provas de curtas distâncias, com duração inferior a um minuto.[57] Por outro lado, Jones et al.[50] propõem cautela, pois o polimorfismo I/D do gene da ECA não deve ser considerado um "gene essencial para o desempenho humano", mas um marcador modulatório, de tal forma que a alta frequência do alelo I seja mais

observada, provavelmente, em atletas engajados em exercícios de resistência aeróbia e a alta frequência do alelo D seja encontrada em atletas praticantes de exercícios de força e potência.

O sistema calicreína-cinina desempenha papel importante no sistema cardiovascular e na síntese da matriz extracelular pelos fibroblastos.[58] A ativação desse sistema induz a vasodilatação coronariana[59] e o aumento da produção de óxido nítrico, um potente vasodilatador.[60,61] Esses efeitos são mediados pelos receptores de cininas acoplados à proteína G, o receptor induzido B1 e o receptor constitutivo B2. A bradicinina, um dos componentes desse sistema, é produzida na musculatura e atua via ligação ao receptor B2, que é codificado pelo gene *BDKRB2*, aumentando a captação de glicose muscular durante o exercício físico.[62] Uma variação no éxon 1 do gene do receptor B2, localizado no cromossomo 14 q32.1-q32.2, determina que a ausência de 9 pb (–9) ou a presença de 9 pb (+9) está associada à variação da atividade transcricional do gene. A deleção de –9 pb promove alta atividade transcricional,[63] gerando maior resposta ao agonista.[64] Williams et al.[65] sugeriram que o alelo –9 está associado com a eficiência da contração muscular e a eventos de longa distância. Saunders et al.[66] mostraram que o genótipo –9/–9 está associado ao alto desempenho de sujeitos que completaram a prova de *triathlon ironman*.

É importante destacar que a ECA tem participação nesses mecanismos, pois cliva a angiotensina I em II, no sistema renina-angiotensina-aldosterona, e degrada a bradicinina no sistema calicreína-cinina. Dessa forma, é importante associar o SNP I/D do gene da ECA às variações no metabolismo desses dois sistemas: tanto as concentrações de angiotensina II e bradicinina quanto as respostas a esses peptídeos vasoativos no sistema dependem do SNP da ECA.[40]

Dentre os locais mais comuns de lesões musculoesqueléticas durante competições e até mesmo em atividades esportivas recreacionais estão os ligamentos e tendões.[67-69] Relatou-se que lesões nos tendões correspondem a aproximadamente 30 a 50% de todas as lesões esportivas registradas,[70] sendo a do tendão calcâneo responsável por 6 a 18% do total.[71] Diversas quimiocinas e seus receptores, relacionados a processos inflamatórios, são responsáveis por mecanismos de danos e reparo muscular. Nesse sentido, a lesão muscular induzida por esforço físico resulta na liberação de substâncias intracelulares dos miócitos afetados, como creatina quinase (CK), mioglobina, cálcio e potássio no sangue. Assim, um dos marcadores de lesão mais comumente utilizados e que reflete lesão muscular é a enzima CK.[72] Alguns indivíduos apresentam concentração elevada de CK em resposta ao exercício físico, o que não é bem compreendido.[72,73] Tem-se sugerido que exista certa influência genética para a variação dessas concentrações, fato que precisa ser mais explorado.[73] Um possível gene candidato é aquele que codifica a enzima CK, o qual é muito expresso no músculo esquelético, sendo importante para o metabolismo e para a produção de energia.[74] A isoforma muscular da enzima CK (CK-MM) está localizada na linha M do retículo sarcoplasmático das miofibrilas.[75] Evidências sugerem que um SNP da CK-MM, localizado em uma região não codificadora conhecida como CK-MM-*NcoI*, pode contribuir para as diferenças observadas no desempenho físico.[76-78]

Outro gene candidato estudado em atletas de alto rendimento é o gene da alfa-actinina-3 (alfa-*ACTN3*).[42,79,80] Um polimorfismo de interesse é o R577X, que se refere a uma troca de uma citosina por uma timina na posição 1747 do éxon 16 no gene *ACTN3*. Essa alteração resulta na conversão do aminoácido arginina em um códon de terminação prematuro no resíduo 577, o que promove a tradução de uma forma não funcional da proteína alfa-actinina 3. Indivíduos homozigotos para o alelo variante X (XX) apresentam ausência total de alfa-actinina 3. O alelo variante X está presente em aproximadamente 18% da população mundial.[80-82] Particularmente, foi encontrada forte associação entre o polimorfismo R577X e o desempenho geral de atletas de elite.[83] Em indivíduos que apresentam os genótipos 577RR ou 577RX, foi demonstrada associação com o bom desempenho atlético nas modalidades predominantes de força, ou seja, dependentes das fibras musculares de contração rápida. Por outro lado, indivíduos carreadores do genótipo 577XX apresentam bom desempenho atlético em modalidades predominantemente de resistência cardiorrespiratória, ou seja, dependentes das fibras musculares de contração lenta.[84]

Dessa forma, conhecendo as variantes genéticas que compõem o genótipo dos indivíduos, é possível estabelecer perfis genéticos, bem como propor estratégias de treinamento físico que levem em consideração esse perfil. A Tabela 32.4 apresenta o exemplo de um indivíduo com perfil genético que favorece um bom desempenho aeróbio e de força muscular; e o Quadro 32.2, uma recomendação de treinamento baseada no perfil do DNA para as variantes genéticas associadas com o desempenho atlético.

Por fim, Williams e Folland[85] recentemente criaram um modelo e uma ferramenta de abordagem poligênica para o desempenho esportivo, por meio de cálculo envolvendo diferentes polimorfismos. Esses pesquisadores tentaram prever a probabilidade de existir um sujeito com o perfil poligênico perfeito para o desempenho nas modalidades predominantemente de resistência. Tal perfil de excelência esportiva nessas modalidades foi obtido a partir da combinação teórica ótima de 23 polimorfismos em genes candidatos a influenciar a variabilidade individual de um ou mais traços fenotípicos. Essas variantes foram

Tabela 32.4 Indivíduo com perfil genético favorável para bom desempenho aeróbio e de força muscular

Gene	Genótipo	Identificação do polimorfismo
ECA	I/D	N/D ACE InDel
BDKRB2	D/I	N/D BDKRB2
NOS3	G/T	rs1799983
VEGF	A/A	rs699947
	A/A	rs1570360
	C/C	rs2010963
EPOR	A/A	N/A EPOR
HBB	C/C	rs12788013
	C/C	rs11036351
CHRM2	A/A	rs324640
PPARgama-C1	G/G	rs8192678
PPARdelta	G/G	rs2016520
CK-MM	T/T	rs1803285
ACTN3	C/T	rs1815739
HIF-1alfa	T/C	rs11549465
AMPD1	G/G	rs17602729
DIO1	T/C	rs11206244
MCT-1	A/A	rs1049434

ACE InDel: enzima conversora de angiotensina I – inserção/deleção; *ACTN3*: gene da proteína alfa actinina-3; *AMPD1*: gene da adenosina monofosfato deaminase 1; *BDKRB2*: gene do receptor de bradicinina do subtipo B2; *CHRM2*: gene do receptor colinérgico muscarínico do subtipo 2; *CK-MM*: gene da enzima creatina quinase muscular; D/I: deleção/inserção; *DIO1*: gene da iodotironina deiodinase tipo 1; *ECA*: gene da enzima conversora de angiotensina; *EPOR*: gene do receptor de eritropoietina; *HBB*: gene da hemoglobina; *HIF-1alfa*: gene da enzima óxido nítrico sintase 3; I/D: inserção/deleção; *MCT-1*: gene do transportador de monocarboxilato tipo 1; N/D: não disponível; *NOS3*: gene da enzima óxido nítrico sintase 3; *PPARgama-C1*: gene do receptor ativado por proliferação de peroxissomos do subtipo gama; *PPARdelta*: gene do receptor ativado por proliferação de peroxissomos do subtipo delta; *VEGF*: gene do fator de crescimento endotelial vascular.
Fonte: adaptada de Kambouris et al.[37]

escolhidas com base em estudos anteriores sobre a associação global de populações caucasianas. Para a combinação alélica teoricamente "ótima" de um gene, foi dada uma pontuação de genótipo individual máximo de 2 (*versus* 1 e 0 para os genótipos intermediário e desfavorável, respectivamente). Os autores então combinaram todas as pontuações individuais e criaram um escore total do genótipo, com um valor máximo possível, ou seja, correspondente ao "perfil poligênico ótimo" para as modalidades predominantemente de resistência de 100. Além disso, determinaram estatisticamente que a probabilidade de um indivíduo existente no planeta com o escore total do genótipo perfeito ou quase perfeito nas modalidades de resistência seria de apenas 0,0005%.[86] É importante destacar que o mesmo grupo de pesquisadores, recentemente, também estabeleceu um modelo de abordagem poligênica por meio do cálculo do escore total do genótipo para o desempenho nas modalidades predominantemente de potência e força.[87]

GENÉTICA E MORTE SÚBITA EM ATLETAS

A morte súbita relacionada ao esporte é considerada um evento que ocorre abruptamente em indivíduos aparentemente saudáveis em até 24 horas após o início dos sintomas. Na população geral, a morte súbita tem uma frequência de 1/1.000, mas aumenta de forma significativa com a presença de doenças cardíacas mais graves.[88,89]

Em geral, a morte súbita relacionada ao esporte é um evento dramático e impactante que acomete jovens atletas (com menos de 35 anos de idade), tendo relação com gênero e idade, modalidade esportiva praticada e região demográfica.[88] No entanto, embora a morte súbita de atletas não seja um evento frequente, na presença de certas doenças cardiovasculares, a exaustão física associada à prática esportiva pode ser o "gatilho" para a ocorrência de arritmias letais e morte súbita causada por canalopatias, ou seja, doenças hereditárias associadas com modificações de genes que codificam proteínas de canais iônicos.[36,88,89] Vale destacar que aproximadamente 80% dos casos de morte súbita não traumática em atletas jovens são causados por anomalias estruturais cardíacas e doenças cardiovasculares hereditárias que ocorrem durante ou imediatamente após as sessões de treinamento físico.[88,90]

Entre as doenças estruturais que podem causar morte súbita em atletas, as mais comuns são a cardiomiopatia hipertrófica (40 a 50% dos casos) e a displasia arritmogênica do ventrículo direito. No entanto, existem algumas enfermidades cardíacas que são geneticamente determinadas, com ou sem alterações morfológicas cardíacas importantes, que predispõem ao aparecimento de arritmias e morte súbita.[88,91,92] Essas doenças são produto de alterações no código genético de quatro grandes famílias de proteínas:

- Proteínas do sarcômero, que geram força nos miócitos cardíacos e são responsáveis pela cardiomiopatia hipertrófica.[93]
- Proteínas do citoesqueleto, que transmitem força para as células adjacentes e podem causar cardiomiopatia dilatada.[94]

Quadro 32.2 Recomendação de treinamento com base no perfil do DNA para as variantes genéticas associadas com o desempenho atlético

Variante	Genótipo	Efeito sobre o desempenho esportivo	Recomendações de treinamento
ECA: In/Del	DD	Capacidade de resistência reduzida e desempenho muscular aumentado	Treinamento para aumentar o desempenho anaeróbio alático. Aumentar o número de sessões de treinamento semanais de forma progressiva, mas rápida. Se necessário, enfatizar o treinamento para aumento da resistência aeróbia. Realizar alta frequência de treinamento de força com cargas submáximas
HBB C551→ T	CC	Adaptação cardiorrespiratória aumentada para o treinamento de resistência. Adaptação mais rápida para o treinamento de resistência com melhora da economia de corrida. Menor necessidade de energia e poupador de glicogênio durante os eventos ou treinamento de longa distância	Reavaliar o uso de substratos e a utilização de energia no ritmo de corrida em três intensidades diferentes (no limiar aeróbio e 5% abaixo e acima do limiar de lactato). Recalcular a energia individual e substratos (carboidratos, proteínas e lipídios) necessários para a distância específica de corrida
EPOR G6002→ A (Try439→ Stop)	AA	Produção aumentada de eritrócitos no sangue, o que é vantajoso para provas de resistência. Adequação para esportes de resistência ou de caráter misto (aeróbio e anaeróbio) ou para aqueles que exigem velocidade	–
ACTN3 (R577 → X)	XX	Metabolismo aumentado de fibras musculares lentas e força muscular reduzida	Preparação física de longo prazo para alcançar a excelência técnica. Realizar muitos treinos com percursos e distâncias similares àqueles realizados em competições. As vantagens na contração muscular rápida conferem maior risco de lesão muscular ao realizar exercícios com intensidade máxima. Realizar exercícios de intensidade submáxima ou aumentar progressivamente a intensidade do exercício
CK-MM Restrição de NcoI A214→ G	GG	Músculos sobrecarregados depois de treinamento intensivo	Para aumentar a resistência, treinar por um longo período para alcançar o nível desejável de desempenho. Aumentar pausas durante o treinamento
MCT-1	TT	Depuração de lactato reduzida	Aprimorar a remoção de lactato, aumentando a intensidade de treinamento para níveis moderados ou altos, pelo menos duas vezes por semana. Realizar recuperação ativa usando exercícios aeróbios com intensidade entre 50 e 60% da frequência cardíaca de reserva. Utilizar intervalos mais longos de recuperação durante o treino intensivo de acordo com o genótipo. Após lesão, prolongar o tempo para a reabilitação completa. Avaliar a taxa de remoção do lactato regularmente

Fonte: adaptada de Kambouris et al.[37]

- Proteínas que codificam canais iônicos, responsáveis pela manutenção da homeostase de íons nos meios intra e extracelular e por arritmias de origem familiar.[95]
- Proteínas desmossomais, que permitem a manutenção da estrutura e a comunicação intercelular. Há relação significativa entre os genes que codificam essas proteínas e certas doenças.[96] Por exemplo, alterações na troponina T podem causar cardiomiopatia dilatada e hipertrófica.[97]

A morte súbita de atletas jovens sempre tem grande repercussão midiática. O monitoramento e a triagem cardiovascular dos atletas para prevenir a morte súbita tem sido tema de muitos debates. Por exemplo, nos Estados Unidos, essa triagem é atualmente baseada na história e exame físico. Já o Comitê Olímpico Internacional (COI) e a Sociedade Europeia de Cardiologia exigem eletrocardiograma (ECG) dos atletas como parte de triagem.[98] Em razão do esforço extremo a que estão submetidos nos treinamentos e competições, é preciso que haja monitoramento e avaliações de pré-participação esportiva, principalmente caso o enfoque seja treinar para competir em alto nível.[99-101]

No entanto, as recomendações e diretrizes médicas dependem da natureza e da gravidade das anomalias e doenças cardiovasculares, bem como do tipo de esporte praticado. Possíveis aplicações da pesquisa genética nessa área são os testes genéticos para triagem de indivíduos com risco aumentado de morte súbita durante a prática esportiva.[102] Isso poderia auxiliar na prevenção desse dramático e impactante evento associado ao esporte. Apesar do grave impacto psicológico, é recomendável a não participação do

indivíduo em modalidades competitivas, caso seja detectada a presença de doenças genéticas que possam causar arritmias cardíacas, especialmente por conta das implicações que o aumento da descarga adrenérgica proporcionada pelo esforço físico pode causar ao organismo, pois ela pode ser o "gatilho" para arritmias potencialmente fatais.

REALIDADE DO *DOPING* GENÉTICO

O *doping* é convencionalmente considerado o uso antiético de substâncias ou métodos que têm como alvo as funções orgânicas, incluindo a cerebral, a metabólica, a cardiovascular, a respiratória, a hematológica e, mais recentemente, a genética.[36] O uso e o suporte teórico para o *doping* genético baseiam-se em conhecimentos advindos da utilização da terapia gênica para o tratamento de doenças. No entanto, uma manobra genética pode, por exemplo, restaurar a expressão proteica reduzida em indivíduos com alguma doença, mas não aumentá-la naqueles saudáveis.[36,103] Com o desenvolvimento da terapia gênica, surgiu o risco do uso não terapêutico de células, genes e elementos genéticos para melhorar o desempenho esportivo. Por isso, a Agência Mundial Antidoping, em 2003, decidiu abrir a discussão, proibir e tornar ilegal o *doping* genético.[104]

O *doping* genético pode ser definido como a inserção de genes no organismo de atletas. Seu objetivo é aumentar ou reduzir a expressão de uma ou mais proteínas em determinado tecido, visando aumentar o desempenho esportivo. Além disso, pode ser usado para acelerar a recuperação de tecido muscular, tendinoso, ósseo e/ou cartilaginoso, no caso de lesões.[105] Por exemplo, um halterofilista pode ser submetido a um procedimento genético para reduzir a expressão de miostatina, uma proteína que inibe o crescimento muscular e, com isso, ter maior massa muscular e apresentar alguma vantagem competitiva.[106]

A realização do *doping* genético pode ser dividida em dois passos: primeiro, é preciso inserir o gene correspondente à proteína de interesse em uma estrutura de um DNA que possa ser injetado no núcleo das células humanas; depois, consiste em injetar o DNA modificado (com o gene que codifica a proteína de interesse) no organismo.[103,106] O gene pode ser inserido no organismo e/ou nas células-alvo das seguintes formas:

- Por meio de vírus. É preciso retirar as estruturas responsáveis pela capacidade de causar infecção, mas manter a capacidade do vírus de atingir o núcleo das células, para que o gene de interesse seja incorporado ao núcleo das células-alvo ou do organismo que se deseja modificar, de tal forma que o vírus consiga utilizar o maquinário nuclear para viabilizar a expressão do novo gene inserido.
- Lipossomos. O gene de interesse é conduzido ao núcleo das células-alvo utilizando-se da estrutura lipídica dos lipossomos, o que lhes confere a capacidade de atravessar as membranas biológicas.
- Arma gênica. Um plasmídeo com o gene de interesse é incorporado a ouro ou tungstênio e injetado no organismo por meio de uma arma gênica.
- Microsseringas. A estrutura com o gene a ser manipulado é inserida nas células por meio de uma microsseringa com o auxílio de um microscópio.

Cabe ressaltar que os dois últimos métodos são utilizados em cultura de células.

É preciso destacar que o *doping* genético pode expor os sujeitos a riscos como infarto do miocárdio, quando a terapia gênica visa aumentar a expressão de eritropoetina (EPO) pelo aumento da viscosidade sanguínea.[107]

O *doping* genético ainda é difícil de ser detectado em exames *antidoping* convencionais. A dificuldade é que essa terapia é direcionada a um tecido específico e a apenas uma ou algumas proteínas.[108] As possíveis proteínas com potencial de utilização para o *doping* genético mencionadas pela literatura são a EPO, o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), o hormônio do crescimento (GH), a miostatina, o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), a endorfina, a encefalina, a alfa-actinina 3 (alfa-ACTN3), o gene do receptor ativado por proliferação de peroxissomos do subtipo delta (PPARdelta) e a fosfoenolpiruvato carboxiquinase citosólica (PEPCK-C).[109]

É preciso destacar que, para que o *doping* genético seja detectado, é necessário realizar procedimentos invasivos, como a biópsia muscular.[108] Alternativa é a criação de um banco de dados genéticos dos atletas com os valores basais de RNA mensageiro ou proteínas-alvo da terapia gênica, buscando verificar a presença de variações bruscas nos valores, que indicariam a utilização do *doping* genético. No entanto, essa alternativa ainda é pouco viável, pois apresenta alto custo para a criação e manutenção do banco de dados; além disso, existe a possibilidade de o *doping* genético ser realizado em proteínas que não estejam catalogadas.[110]

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O sucesso esportivo é resultado de uma combinação multifatorial bem-sucedida. Dentre a miríade de fatores a serem considerados, tem-se a genética e suas interações favoráveis com o ambiente, o estilo e o histórico de vida, o perfil psicológico, o biotipo corporal, o tipo de treinamento, a alimentação e os aspectos motivacionais. No

entanto, é improvável que o desempenho excepcional dos atletas de elite seja apenas consequência de características genéticas, pois o funcionamento do organismo é resultado da interação de múltiplos fatores genéticos com os inúmeros estímulos ambientais a que os indivíduos estão expostos. Além disso, quando se fala do desempenho esportivo, é preciso considerar que os indivíduos apresentam diferentes níveis de treinabilidade e responsividade aos mesmos estímulos.

Já foram descritos polimorfismos associados ao desempenho físico, como à resistência cardiorrespiratória, à força muscular, aos traços de desempenho muscular e à intolerância ao exercício. Além disso, o número de polimorfismos genéticos candidatos a explicar as variações individuais no desempenho esportivo só aumenta e os avanços da genética esportiva caminham paralelamente ao crescimento da complexidade e das diversidades entre os estudos, pois diferenças quanto ao gênero, aos grupos étnicos (ancestralidade) nos grupos estudados, assim como as metodologias estatísticas utilizadas, dificultam a comparação de resultados. Uma vez que essas características estão frequentemente associadas ao controle gênico, o conhecimento da frequência dessas alterações pode ser de grande valia na preconização de treinos, na escolha de exercícios a serem aplicados ao atleta ou mesmo na melhora da qualidade de vida.

Outra situação que demanda atenção é a morte súbita associada à prática esportiva. A morte súbita de atletas é um evento de grande impacto e repercussão na sociedade. O monitoramento e a triagem cardiovascular pré-participação esportiva, para prevenir essa situação dramática, têm sido utilizados. Nesse sentido, os testes genéticos poderiam ser úteis na seleção e triagem de indivíduos com risco aumentado de morte súbita durante a prática esportiva. Caso seja detectada a presença de doenças genéticas que possam causar arritmias cardíacas, é recomendável não participar de exercícios físicos em nível competitivo, em razão da possibilidade de arritmias fatais.

Adicionalmente, é preciso que os profissionais da área esportiva (técnicos, professores, treinadores, pesquisadores, fisiologistas etc.) estejam sempre atentos com relação à realidade cada vez mais palpável do *doping* genético entre esportistas. Ao longo dos anos, com o aprimoramento da terapia gênica, surge também o risco da utilização não terapêutica com vistas a melhorar o desempenho esportivo. No entanto, é preciso cautela, pois os efeitos e riscos para o organismo e a saúde ainda são pouco conhecidos e é provável que os riscos superem os benefícios.

Em conclusão, pode-se afirmar que a genética terá grande impacto no futuro da atividade esportiva, pois servirá para orientar de forma mais precisa a atividade física para iniciantes e, desta forma, favorecerá a adesão de praticantes. Também contribuirá para a preservação da integridade física e da longevidade esportiva dos atletas, bem como com a saúde e a qualidade de vida da população geral. Por fim, poderá auxiliar na identificação de possíveis atletas em risco de morte súbita, na descoberta de talentos e na formação de atletas de elite.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdollahi MR, Gaunt TR, Syddall HE, Cooper C, Phillips DI, Ye S et al. Angiotensin II type I receptor gene polymorphism: anthropometric and metabolic syndrome traits. J Med Genet 2005;42(5):396-401.
2. Tucker R, Collins M. What makes champions? A review of the relative contribution of genes and training to sporting success. Br J Sports Med. 2012;46(8):555-61.
3. Wilber RL, Pitsiladis YP. Kenyan and Ethiopian distance runners: what makes them so good? Int J Sports Physiol Perform. 2012;7(2):92-102.
4. Scott RA, Pitsiladis YP. Genotypes and Distance Running Clues from Africa. Sports Med. 2007;37(4-6):424-7.
5. Feuk L, Marshall CR, Wintle RF, Scherer SW. Structural variants: changing the landscape of chromosomes and design of disease studies. Hum Mol Genet. 2006;15(1):R57-66.
6. Puthucheary Z, Skipworth JR, Rawal J, Loosemore M, Van Someren K, Montgomery HE. Genetic influences in sport and physical performance. Sports Med. 2011;41(10):845-59.
7. Beunen G, Thomis M. Gene powered? Where to go from heritability (h2) in muscle strength and power? Exerc Sport Sci Rev. 2004;32(4):148-54.
8. Skinner JS. Do genes determine champions? Gatorade Sports Science Institute Sports Science Exchance. 2001;14:1-4.
9. Bouchard C, Dionne FT, Simoneau JA, Boulay MR. Genetics of aerobic and anaerobic performances. Exerc Sport Sci Rev. 1992;20:27-58.
10. Rankinen T, Bray MS, Hagberg JM, Pérusse L, Roth SM, Wolfarth B et al. The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2005 update. Med Sci Sports Exerc. 2006;38(11):1863-88.
11. Baker J, Horton S, Robertson-Wilson J, Wall M. Nurturing sport expertise: factors influencing the development of elite athlete. J Sports Sci Med. 2003;2(1):1-9.
12. Hopkins WG. Genes and training for athletic performance. Sportscience 2001;5(1). Disponível em: sportsci.org/jour/0101/wghgene.htm. Acessado em: 27 nov. 2014.
13. Singer RN, Janelle CM. Determining sport expertise: From genes to supremes. Int J Sports Psychology. 1999;30:117-50.
14. Ericsson KA, Krampe RT, Tesch-Römer C. The role of deliberate practice in the acquisition of expert performance. Psychological Review. 1993;100:363-406.
15. Gustin WC. The development of exceptional research mathematicians. In: Developing talent in young people. New York: Bloom; 1985.
16. Kalinowski AG. The development of olympic swimmers. In: Developing talent in young people. New York: Bloom; 1985.
17. Monsaas JA. Learning to be a world-class tennis player. In: Developing talent in young people. New York: Bloom; 1985.

18. Ericsson KA, Nandagopal K, Roring RW. Toward a science of exceptional achievement: attaining superior performance through deliberate practice. Ann N Y Acad Sci. 2009;1172:199-217.
19. Elferink-Gemser MT, Jordet G, Coelho-e-Silva MJ, Visscher C. The marvels of elite sports: how to get there? Br J Sports Med. 2011;45(9):683-4.
20. Druzhevskaya AM, Ahmetov II, Astratenkova IV, Rogozkin VA. Association of the ACTN3 R577X polymorphism with power athlete status in Russians. Eur J Appl Physiol. 2008;103(6):631-34.
21. Phillips E, Davids K, Renshaw I, Portus M. Expert performance in sport and the dynamics of talent development. Sports Med. 2010;40(4):271-83.
22. Van Damme R, Wilson RS, Vanhooydonck B, Aerts P. Performance constraints in decathletes. Nature. 2002;415(6873):755-6.
23. Smith DJ. A framework for understanding the training process leading to elite performance. Sports Med. 2003;33(15):1103-26.
24. Brutsaert TD, Parra EJ, Shriver MD, Gamboa A, Rivera-Ch M, León-Velarde F. Ancestry explains the blunted ventilatory response to sustained hypoxia and lower exercise ventilation of Quechua altitude natives. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2005;289(1):R225-34.
25. Rankinen T, Gagnon J, Pérusse L, Chagnon YC, Rice T, Leon AS et al. AGT M235T and ACE ID polymorphisms and exercise blood pressure in The Heritage Family Study. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2000;279(1):H368-74.
26. Bray MS, Hagberg JM, Pérusse L, Rankinen T, Roth SM, Wolfarth B et al. The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2006-2007 update. Med Sci Sports Exerc. 2009;41(1):35-73.
27. Yu M, Blomstrand E, Chibalin AV, Krook A, Zierath JR. Marathon running increases ERK1/2 and p38 MAP kinase signalling to downstream targets in human skeletal muscle. J Physiol. 2001;536(Pt 1):273-82.
28. Yu M, Blomstrand E, Chibalin AV, Wallberg-Henriksson H, Zierath JR, Krook A. Exercise-associated differences in an array of proteins involved in signal transduction and glucose transport. J Appl Physiol. 2001b;90(1):29-34.
29. Myburgh KH. What makes an endurance athlete world-class? Not simply a physiological conundrum. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 2003;136(1):171-90.
30. Neufer PD, Dohm GL. Exercise induces a transient increase in transcription of the GLUT-4 gene in skeletal muscle. Am J Physiol. 1993;265(6 Pt 1):C1597-603.
31. Hoppeler H, Flück M. Normal mammalian skeletal muscle and its phenotypic plasticity. J Exp Biol. 2002;205(Pt 15):2143-52.
32. Hawley JA. Adaptations of skeletal muscle to prolonged, intense endurance training. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2002;29(3):218-22.
33. Martineau LC, Gardiner PF. Insight into skeletal muscle mechanotransduction: MAPK activation is quantitatively related to tension. J Appl Physiol. 2001;91(2):693-702.
34. Pilegaard H, Ordway GA, Saltin B, Neufer PD. Transcriptional regulation of gene expression in human skeletal muscle during recovery from exercise. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2000;279(4):E806-14.
35. Puntschart A, Claassen H, Jostarndt K, Hoppeler H, Billeter R. mRNAs of enzymes involved in energy metabolism and mtDNA are increased in endurance-trained athletes. Am J Physiol. 1995;269(3 Pt 1):C619-25.
36. Lippi G, Longo UG, Maffulli N. Genetics and sports. Br Med Bull. 2010;93:27-47.
37. Kambouris M, Ntalouka F, Ziogas G, Maffulli N. Predictive genomics DNA profiling for athletic performance. Recent Pat DNA Gene Seq. 2012;6(3):229-39.
38. Coates D. The angiotensin converting enzyme (ACE). Int J Biochem Cell Biol. 2003;35(6):769-73.
39. Myerson S, Hemingway H, Budget R, Martin J, Humphries S, Montgomery H. Human angiotensin I-converting enzyme gene and endurance performance. J Appl Physiol. 1999;87(4):1313-6.
40. Zhang X, Wang C, Dai H, Lin Y, Zhang J. Association between angiotensin-converting enzyme gene polymorphisms and exercise performance in patients with COPD. Respirology. 2008;13(5):683-8.
41. Ash GI, Scott RA, Deason M, Dawson TA, Wolde B, Bekele Z et al. No association between ACE gene variation and endurance athlete status in Ethiopians. Med Sci Sports Exerc. 2011;43(4):590-7.
42. Yang N, MacArthur DG, Wolde B, Onywera VO, Boit MK, Lau SY et al. The ACTN3 R577X polymorphism in East and West African athletes. Med Sci Sports Exerc. 2007;39(11):1985-8.
43. Scott RA, Wilson RH, Goodwin WH, Moran CN, Georgiades E, Wolde B et al. Mitochondrial DNA lineages of elite Ethiopian athletes. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2005a;140(3):497-503.
44. Scott RA, Moran C, Wilson RH, Onywera V, Boit MK, Goodwin WH et al. No association between angiotensin converting enzyme (ACE) gene variation and endurance athlete status in Kenyans. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 2005b;141(2):169-75.
45. Jones A, Woods DR. Skeletal muscle RAS and exercise performance. Int J Biochem Cell Biol. 2003;35(6):855-66.
46. Brink M, Wellen J, Delafontaine P. Angiotensin II causes weight loss and decreases circulating insulin-like growth factor I in rats through a pressor-independent mechanism. J Clin Invest. 1996;97(11):2509-16.
47. Gordon SE, Davis BS, Carlson CJ, Booth FW. ANG II is required for optimal overload-induced skeletal muscle hypertrophy. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2001;280(1):E150-9.
48. Almeida SS, Barros CC, Moraes MR, Russo FJ, Haro AS, Rosa TS et al. Plasma Kallikrein and Angiotensin I-converting enzyme N- and C-terminal domain activities are modulated by the insertion/deletion polymorphism. Neuropeptides. 2010;44(2):139-43.
49. Danser AH, Schalekamp MA, Bax WA, van den Brink AM, Saxena PR, Riegger GA et al. Angiotensin-converting enzyme in the human heart. Effect of the deletion/insertion polymorphism. Circulation. 1995;92(6):1387-8.
50. Jones A, Montgomery HE, Woods DR. Human performance: a role for the ACE genotype? Exerc Sport Sci Rev. 2002;30(4):184-90.
51. Williams AG, Rayson MP, Jubb M, World M, Woods DR, Hayward M et al. The ACE gene and muscle performance. Nature. 2000;403(6770):614.
52. Williams AG, Rayson MP, Jubb M, World M, Woods DR, Hayward M, Martin J, Humphries SE, Montgomery HE. The ACE gene and muscle performance. Nature. 2000;403(6770):614.
53. Onywera VO, Scott RA, Boit MK, Pitsiladis YP. Demographic characteristics of elite Kenyan endurance runners. J Sports Sci. 2006;24(4):415-22.
54. Montgomery HE, Marshall R, Hemingway H, Myerson S, Clarkson P, Dollery C et al. Human gene for physical performance. Nature. 1998;393(6682):221-22.
55. Gayagay G, Yu B, Hambly B, Boston T, Hahn A, Celermajer DS et al. Elite endurance athletes and the ACE I allele – the role of genes in athletic performance. Hum Genet. 1998;103(1):48-50.
56. Woods DR, World M, Rayson MP, Williams AG, Jubb M, Jamshidi Y et al. Endurance enhancement related to the human angio-

tensin I-converting enzyme I-D polymorphism is not due to differences in the cardiorespiratory response to training. Eur J Appl Physiol. 2002;86(3):240-44.
57. Nazarov IB, Woods DR, Montgomery HE, Shneider OV, Kazakov VI, Tomilin NV et al. The angiotensin converting enzyme I/D polymorphism in Russian athletes. Eur J Hum Genet. 2001;9(10):797-801.
58. Burch RM, Kyle DJ. Recent developments in the understanding of bradykinin receptors. Life Sci. 1992;50(12):829-38.
59. Su JB, Houël R, Héloire F, Barbe F, Beverelli F, Sambin L et al. Stimulation of bradykinin B(1) receptors induces vasodilation in conductance and resistance coronary vessels in conscious dogs: comparison with B(2) receptor stimulation. Circulation. 2000;101(15):1848-53.
60. Shen W, Zhang X, Zhao G, Wolin MS, Sessa W, Hintze TH. Nitric oxide production and NO synthase gene expression contribute to vascular regulation during exercise. Med Sci Sports Exerc. 1995;27(8):1125-34.
61. Dietze GJ, Wicklmayr M, Rett K, Jacob S, Henriksen EJ. Potential role of bradykinin in forearm muscle metabolism in humans. Diabetes. 1996;45(Suppl 1):S110-4.
62. Dietze GJ. Modulation of the action of insulin in relation to the energy state in skeletal muscle tissue: possible involvement of kinins and prostaglandins. Mol Cell Endocrinol. 1982;25(2):127-49.
63. Braun A, Kammerer S, Maier E, Böhme E, Roscher AA. Polymorphisms in the gene for the human B2-bradykinin receptor. New tools in assessing a genetic risk for bradykinin-associated diseases. Immunopharmacology. 1996;33(1-3):32-35.
64. Payne J, Montgomery H. The renin-angiotensin system and physical performance. Biochem Soc Trans. 2003;31(Pt 6):1286-89.
65. Williams AG, Dhamrait SS, Wootton PT, Day SH, Hawe E, Payne JR et al. Bradykinin receptor gene variant and human physical performance. J Appl Physiol. 2004;96(3):938-42.
66. Saunders CJ, Xenophontos SL, Cariolou MA, Anastassiades LC, Noakes TD, Collins M. The bradykinin beta 2 receptor (BDKRB2) and endothelial nitric oxide synthase 3 (NOS3) genes and endurance performance during Ironman Triathlons. Hum Mol Genet. 2006;15(6):979-87.
67. Rees JD, Wilson AM, Wolman RL. Current concepts in the management of tendon disorders. Rheumatology (Oxford). 2006;45(5):508-21.
68. Woo SL, Abramowitch SD, Kilger R, Liang R. Biomechanics of knee ligaments: injury, healing, and repair. J Biomech. 2006;39(1):1-20.
69. Harvie P, Ostlere SJ, Teh J, McNally EG, Clipsham K, Burston BJ et al. Genetic influences in the aetiology of tears of the rotator cuff. Sibling risk of a full-thickness tear. J Bone Joint Surg Br. 2004;86(5):696-700.
70. Järvinen TA, Kannus P, Maffulli N, Khan KM. Achilles tendon disorders: etiology and epidemiology. Foot Ankle Clin. 2005;10(2):255-66.
71. Mazzone MF, McCue T. Common conditions of the achilles tendon. Am Fam Physician. 2002;65(9):1805-10.
72. Totsuka M, Nakaji S, Suzuki K, Sugawara K, Sato K. Break point of serum creatine kinase release after endurance exercise. J Appl Physiol. 2002;93(4):1280-6.
73. Warren JD, Blumbergs PC, Thompson PD. Rhabdomyolysis: a review. Muscle Nerve. 2002;25(3):332-47.
74. Field ML, Khan O, Abbaraju J, Clark JF. Functional compartmentation of glycogen phosphorylase with creatine kinase and Ca2+ ATPase in skeletal muscle. J Theor Biol. 2006;238(2):257-68.
75. Roman BB, Wieringa B, Koretsky AP. Functional equivalence of creatine kinase isoforms in mouse skeletal muscle. J Biol Chem. 1997;272(28):17790-94.
76. Zhang J, Yu KF. What's the relative risk? A method of correcting the odds ratio in cohort studies of common outcomes. Jama. 1998;280(19):1690-91.
77. Wilson IA, Brindle KM, Fulton AM. Differential localization of the mRNA of the M and B isoforms of creatine kinase in myoblasts. Biochem J. 1995;308(Pt 2):599-605.
78. Bouchard C, Simoneau JA, Lortie G, Boulay MR, Marcotte M, Thibault MC. Genetic effects in human skeletal muscle fiber type distribution and enzyme activities. Can J Physiol Pharmacol. 1986;64(9):1245-51.
79. Yang N, MacArthur DG, Gulbin JP, Hahn AG, Beggs AH, Easteal S et al. ACTN3 genotype is associated with human elite athletic performance. Am J Hum Genet. 2003;73(3):627-31.
80. Mills M, Yang N, Weinberger R, Vander Woude DL, Beggs AH, Easteal S et al. Differential expression of the actin-binding proteins, alpha-actinin-2 and -3, in different species: implications for the evolution of functional redundancy. Hum Mol Genet. 2001;10(13):1335-46.
81. North K, Beggs A. Deficiency of a skeletal muscle isoform of alpha-actinin (alpha-actinin-3) in merosin-positive congenital muscular dystrophy. Neuromuscular Disorders. 1996;6(4):229-35.
82. North KN, Yang N, Wattanasirichaigoon D, Mills M, Easteal S, Beggs AH. A common nonsense mutation results in alpha--actinin-3 deficiency in the general population. Nat Genet. 1999;21(4):353-4.
83. Norman B, Esbjörnsson M, Rundqvist H, Osterlund T, von Walden F, Tesch PA. Strength, power, fiber types, and mRNA expression in trained men and women with different ACTN3 R577X genotypes. J Appl Physiol. 2009;106(3):959-65.
84. McCauley T, Mastana SS, Hossack J, MacDonald M, Folland JP. Human angiotensin-converting enzyme I/D and alpha-actinin 3 R577X genotypes and muscle functional and contractile properties. Exp Physiol. 2009;94(1):81-89.
85. Williams AG, Folland JP. Similarity of polygenic profiles limits the potential for elite human physical performance. J Physiol. 2008;586(1):113-21.
86. Santiago C, Ruiz JR, Muniesa CA, González-Freire M, Gómez-Gallego F, Lucia A. Does the polygenic profile determine the potential for becoming a world-class athlete? Insights from the sport of rowing. Scand J Med Sci Sports. 2010;20(1):e188-94.
87. Hughes DC, Day SH, Ahmetov II, Williams AG. Genetics of muscle strength and power: polygenic profile similarity limits skeletal muscle performance. J Sports Sci. 2011;29(13):1425-34.
88. Sàncheza J, Campuzanob O, Iglesiasb A, Brugadab R. Genetics and sports. Apunts Med Esport. 2009;162:86-97.
89. Link MS. Prevention of sudden cardiac death: return to sport considerations in athletes with identified cardiovascular abnormalities. Br J Sports Med. 2009;43(9):685-89.
90. Maron BJ, Shirani J, Poliac LC et al. Sudden death in young competitive athletes. Clinical, demographic, and pathological profiles. Jama. 1996;276(3):199-204.
91. Farwell D, Gollob MH. Electrical heart disease: Genetic and molecular basis of cardiac arrhythmias in normal structural hearts. Can J Cardiol. 2007;23(Suppl A):16A-22A.
92. Brugada R, Brugada J, Brugada P. Genetics and arrhythmias. Rev Esp Cardiol. 2002;55(4):432-7. Review.
93. Marian AJ, Roberts R. Molecular genetics of hypertrophic cardiomyopathy. Annu Rev Med. 1995;46:213-22.

94. Olson TM, Michels VV, Thibodeau SN, Tai YS, Keating MT. Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure. Science. 1998;280(5364):750-52.
95. Roden DM, George AL Jr. The cardiac ion channels: relevance to management of arrhythmias. Annu Rev Med. 1996;47:135-48. Review.
96. Cirino AL, Ho CY. Genetic testing in cardiac disease: from bench to bedside. Nat Clin Pract Cardiovasc Med. 2006;3(9):462-63.
97. Li D, Czernuszewicz GZ, Gonzalez O, Tapscott T, Karibe A, Durand JB et al. Novel cardiac troponin T mutation as a cause of familial dilated cardiomyopathy. Circulation. 2001;104(18):2188-93.
98. Patel DR, Luckstead EF Sr. Update on cardiovascular screening: can we prevent sudden cardiac death in adolescent athletes? Adolesc Med State Art Rev. 2013;24(1):225-41, XIV. Review.
99. Maron BJ, Isner JM, McKenna WJ. 26th Bethesda conference: recommendations for determining eligibility for competition in athletes with cardiovascular abnormalities. Task Force 3: hypertrophic cardiomyopathy, myocarditis and other myopericardial diseases and mitral valve prolapse. J Am Coll Cardiol. 1994;24(4):880-5.
100. Huston TP, Puffer JC, Rodney WM. The athletic heart syndrome. N Engl J Med. 1985;313(1):24-32. Review.
101. Fagard R, Aubert A, Lysens R et al. Noninvasive assessment of seasonal variations in cardiac structure and function in cyclists. Circulation. 1983;67(4):896-901.
102. Wackerhage H, Miah A, Harris RC, Montgomery HE, Williams AG. Genetic research and testing in sport and exercise science: a review of the issues. J Sports Sci. 2009;27(11):1109-16.
103. Haisma HJ, de Hon O. Gene doping. Int J Sports Med. 2006;27(4):257-66. Review.
104. Pokrywka A, Kaliszewski P, Majorczyk E, Zembroń-Łacny A. Genes in sport and doping. Biol Sport. 2013;30(3):155-61.
105. Gould D. Gene doping: gene delivery for olympic victory. Br J Clin Pharmacol. 2013;76(2):292-8. doi: 10.1111/bcp.12010. Review.
106. Gaffney GR, Parisotto R. Gene doping: a review of performance-enhancing genetics. Pediatr Clin North Am. 2007;54(4):807-22, XII-XIII. Review.
107. Kimmelman J. Recent developments in gene transfer: risk and ethics. BMJ. 2005;330(7482):79-82. Review.
108. Baoutina A, Alexander IE, Rasko JE, Emslie KR. Developing strategies for detection of gene doping. J Gene Med. 2008;10(1):3-20. Review.
109. Van der Gronde T, de Hon O, Haisma HJ, Pieters T. Gene doping: an overview and current implications for athletes. Br J Sports Med. 2013;47(11):670-78.
110. Bueno Junior CR, Pereira MG. Biologia molecular como ferramenta no esporte de alto rendimento: possibilidades e perspectivas. Rev Bras Ciênc Esporte. 2010;31(3):231-49.

Bases biológicas e moleculares do envelhecimento

33

Márcia Regina Cominetti

INTRODUÇÃO

O envelhecimento populacional é um fenômeno mundial. Em 1900, apenas 4,1% das 76 milhões de pessoas nos Estados Unidos tinham 65 anos de idade ou mais e apenas 3,2% estavam na faixa etária de 85 anos ou mais. Em 1950, esses percentuais já haviam praticamente dobrado e mais de 8% da população total tinha 65 anos de idade ou mais. Em 2000, esse valor alcançou 12,6%. No Brasil, em 1980, o número de pessoas com 65 anos ou mais correspondia a 4%; em 2000, esse número aumentou para 5,8% e, em 2010, para 7,4%, demonstrando no país um ritmo semelhante de aumento quando comparado ao restante da população mundial. Em 2025, espera-se que o Brasil seja o sexto país do mundo em número de idosos.[1]

O envelhecimento é definido como o acúmulo de diversas alterações deletérias que ocorrem em células e tecidos do corpo com o avanço da idade, as quais são responsáveis pelo aumento do risco de doenças e de morte. O envelhecimento, em termos evolutivos, não foi um evento esperado para a espécie humana, uma vez que, há alguns séculos, o tempo de vida não passava de 40 anos. O aumento na expectativa da vida humana pode ser explicado em razão das transições demográfica e epidemiológica ocorridas no século XX e que continuam neste século, as quais trouxeram consigo mudanças na estrutura populacional mundial e permitiram o envelhecimento humano. Com a melhoria das condições sanitárias, a evolução dos tratamentos médicos, o surgimento das vacinas, as novas tecnologias, entre outros fatores, o ser humano passou a viver mais, apresentando expectativa de vida maior. Na natureza, entretanto, é muito raro encontrar espécies que envelhecem, pois morrem cedo, vítimas de predadores, doenças, fome ou outras condições adversas com as quais se defrontam.[2]

O envelhecimento em humanos está associado ao grande aumento da incidência de várias doenças crônicas não transmissíveis, incluindo doenças cardiovasculares, diabete melito tipo 2 e câncer, bem como de condições degenerativas, como a doença de Alzheimer, também conhecidas como condições relacionadas à idade. O envelhecimento, entretanto, não deve ser associado somente com características deletérias ou prejudiciais, embora existam, de fato, perdas fisiológicas nos diferentes sistemas do organismo, inerentes ao processo de envelhecimento. Ao contrário, o envelhecimento pode acontecer de maneira saudável. Esse tipo de envelhecimento é conhecido como senescência, ou seja, o conjunto de modificações orgânicas decorrentes do processo natural de envelhecimento. A senescência implica perda progressiva da capacidade de adaptação do organismo mediante sobrecarga, com diminuição da reserva funcional, porém sem acarretar prejuízos marcantes à autonomia e à independência do indivíduo. Por outro lado, o envelhecimento pode estar relacionado com doenças, situação caracterizada como senilidade. A sobrecarga decorrente das doenças, somada à perda da capacidade de manutenção da homeostasia que ocorre normalmente no envelhecimento, desencadeia no organismo prejuízos à autonomia e à independência.[3]

Apesar dos avanços das tecnologias relacionadas à saúde, as quais proporcionam o aumento da longevidade, ao longo do ciclo vital ocorrem inúmeras alterações que frequentemente resultam na perturbação da homeostasia orgânica. Muitas dessas mudanças são geneticamente controladas para acontecer e são responsáveis por grande parte dos efeitos deletérios observados no envelhecimento. Outras são influenciadas por fatores externos, como estilo de vida, alimentação e outros fatores ambientais. Embora o envelhecimento seja praticamente

um padrão entre os organismos eucarióticos, os mecanismos moleculares subjacentes a esse processo continuam sendo pouco compreendidos e amplamente investigados. O envelhecimento ocorre, pelo menos em parte, como consequência dos ajustes necessários para a manutenção da homeostasia diante dos danos que acontecem ao longo do ciclo vital, associados à informação do genoma e a marcas epigenéticas. Este capítulo abordará os principais mecanismos moleculares e celulares relacionados ao envelhecimento humano, com enfoque especial em aspectos da genômica nutricional.

ASPECTOS BIOLÓGICOS BÁSICOS DO ENVELHECIMENTO

Existem mais de 300 teorias que tentam explicar o processo de envelhecimento humano; entretanto, algumas questões ainda não são completamente compreendidas, como por que o organismo envelhece ou quando se inicia, de fato, o processo de envelhecimento.[4] A maneira como o processo de envelhecimento ocorre é variável até mesmo entre os indivíduos de uma mesma espécie e também em diferentes órgãos de um mesmo organismo. Essa constatação deu origem ao desenvolvimento de diversas definições de envelhecimento biológico que, apesar de divergirem em vários pontos teóricos, compartilham a noção de que se trata de perda progressiva da funcionalidade que acompanha a idade cronológica e resulta em maior vulnerabilidade às doenças, promovendo desequilíbrio na homeostasia corporal e tornando, por fim, o indivíduo mais suscetível às doenças e à morte. Entretanto, a velocidade com que essas alterações ocorrerão em cada indivíduo depende da interação entre o genoma, os eventos epigenéticos e os fatores ambientais.

As teorias biológicas do envelhecimento foram classificadas em diferentes tipos, como evolucionárias, fisiológicas, estruturais e funcionais. Outra classificação as define como programadas ou estocásticas.[5] Fatores estocásticos se referem àqueles que não seguem um padrão programado, sequencial ou coordenado, mas representam eventos aleatórios, os quais surgem ao acaso e promovem os efeitos deletérios inerentes ao envelhecimento, como a quantidade de dano oxidativo a que uma célula é exposta ao longo de sua vida. Por outro lado, fatores programados representam alterações planejadas, sequenciais e coordenadas, quase sempre associadas ao código genético, as quais culminam nos efeitos deletérios do envelhecimento, como polimorfismos genéticos que resultam em alteração da atividade de enzimas de reparo do DNA[6] e que são transmitidos aos descendentes.

As principais teorias estocásticas e sistêmicas para o envelhecimento são apresentadas no Quadro 33.1. As teorias estocásticas referem-se às alterações pós-traducionais em proteínas, ao dano oxidativo ocasionado por espécies reativas de oxigênio (ERO) e às mutações em células somáticas. As mudanças pós-traducionais referem-se principalmente à formação dos produtos finais de glicação avançada (AGE, *advanced glycation end-products*), ou seja, ligação cruzada de açúcares e proteínas, em razão, principalmente, da hiperglicemia crônica comum no envelhecimento, favorecendo danos em proteínas importantes, tornando-as ineficazes e promovendo o surgimento de doenças.[7,8]

Quadro 33.1 Principais teorias estocásticas e programadas do envelhecimento

Teorias	Hipótese
	Estocásticas
Alterações pós-traducionais em proteínas	Alterações em proteínas, principalmente glicação, afetam sua atividade e a eficiência da célula
Dano oxidativo por espécies reativas de oxigênio	A longevidade é inversamente proporcional à extensão do dano oxidativo e diretamente proporcional à atividade das defesas antioxidantes. O envelhecimento é atribuído aos danos produzidos pelos radicais livres
Mutações somáticas	Acúmulo de mutações em células somáticas ao longo da vida altera a informação genética e reduz a eficiência da célula
	Programadas
Genéticas	Encurtamento telomérico provoca perdas de partes dos cromossomos e alterações nos padrões de expressão gênica
Apoptose	Falhas no processo de morte celular programada colaboram para o envelhecimento celular
Neuroendócrinas	Estresse crônico leva ao colapso da homeostasia corporal, à senescência e à morte

A teoria das mutações somáticas propõe que os danos contínuos ao DNA, causados por agentes exógenos, como radiação, luz ultravioleta, produtos químicos, e também por agentes endógenos, como ERO produzidas a partir do metabolismo celular, causam danos e mutações no DNA genômico. Embora as células apresentem mecanismos eficientes de reparo de DNA, mutações ainda ocorrem ao longo do envelhecimento celular. Essa dinâmica resulta em acúmulo de erros que influenciam o processo de envelhecimento. As mutações são irreversíveis e, em muitos casos, prejudiciais para as células, e seu acúmulo é a base da teoria das mutações somáticas do envelhecimento.[9]

A teoria dos radicais livres foi primeiramente proposta por Denham Harman e, na década de 1970, foi reformulada por esse autor, considerando a produção mitocondrial de ERO.[10] As ERO são espécies químicas altamente reativas, em virtude da presença de elétrons não pareados em sua camada orbital mais externa. Essas espécies são muito instáveis, podendo reagir com moléculas orgânicas ou inorgânicas, incluindo proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos, oxidando-as e prejudicando suas funções normais. Além disso, as ERO têm funções importantes e bem estabelecidas na fisiopatologia de muitas doenças, incluindo câncer, hipertensão, aterosclerose e doenças neurodegenerativas.[11-14] A proposta central da teoria do dano oxidativo por radicais livres é a de que o envelhecimento seria causado pelo efeito deletério das ERO sobre o organismo.

Dentre as teorias programadas, estão as genéticas, a da apoptose e as neuroendócrinas. As primeiras têm estrita relação com os telômeros, estruturas presentes nas extremidades dos cromossomos, ricas em sequências TTAGGG repetitivas e não codificantes.[15] Em razão de uma limitação funcional da maquinaria de replicação do DNA celular, a DNA polimerase não é capaz de duplicar totalmente as extremidades dos cromossomos, fazendo com que, a cada divisão celular, os telômeros sejam levemente encurtados. Células que apresentam baixa taxa de divisão, como as ósseas, não sofrem tanto os efeitos desse encurtamento telomérico; entretanto, células que se renovam frequentemente, portanto com altas taxas de divisão celular, como as do epitélio intestinal ou sanguíneas, são mais influenciadas pelo encurtamento dos telômeros.[16]

A primeira ligação entre o comprimento dos telômeros e o processo de envelhecimento veio da observação de que fibroblastos humanos tinham telômeros menores conforme a idade do doador era maior e que, atingido determinado comprimento telomérico, havia perda da capacidade proliferativa desses fibroblastos. Assim, haveria um "relógio biológico" determinando a senescência replicativa da célula. Em cultura de células de mamíferos, esse relógio ficou conhecido como limite de senescência de Hayflick,[17] que corresponde a aproximadamente 50 divisões celulares. Após esse limite, o encurtamento telomérico é tão grave que começa a danificar regiões do cromossomo que codificam genes importantes para a célula e esta passa a não ser mais capaz de proliferar em cultura.[18] Um forte argumento a favor dessa teoria é o fato de que células tumorais são imortais e apresentam telomerase ativa, repondo sempre a perda telomérica, o que não acontece em células somáticas.[19-21] A telomerase é uma ribonucleoproteína que utiliza a sua subunidade RNA como molde para a síntese de DNA telomérico nas extremidades de cromossomos eucariontes, enquanto o seu componente proteico atua como polimerase. Esse processo ocorre para compensar a incapacidade de DNA polimerases convencionais em replicar completamente as extremidades do DNA.[22] O estudo dessa interessante enzima rendeu aos pesquisadores Elizabeth Blackburn, Carol Greider e Jack Szostak o prêmio Nobel em Fisiologia ou Medicina em 2009.[23]

A teoria da apoptose afirma que falhas nesse mecanismo promovem o envelhecimento. A apoptose é um processo de morte celular programada fundamental e inerente a todas as células do corpo humano. Ela desempenha papel crítico em diversos processos fisiológicos, bem como em condições patológicas. A morte celular programada mantém a homeostasia pela eliminação controlada das células que não são mais necessárias ao organismo ou que sofreram algum dano. Um argumento a favor dessa teoria é o de que células tumorais possuem estratégias para burlar o processo apoptótico, impedindo sua morte e resultando no desenvolvimento de câncer, doença comum no envelhecimento.[24]

Por fim, as teorias neuroendócrinas relacionam concentrações elevadas de hormônios, como o cortisol, e de citocinas pró-inflamatórias com o estresse crônico ao longo dos anos e seus efeitos em condições de maior suscetibilidade a infecções, comprometimento cognitivo, fragilidade, entre outras condições, comuns no envelhecimento.[4]

Acredita-se que o processo de envelhecimento ocorra por meio da cooperação entre as diferentes teorias propostas. Assim, organismos com constituição genética que propicie melhor adaptação ou que sofrem exposição menos exacerbada aos fatores extrínsecos prejudiciais podem manifestar menores déficits celulares, o que retardaria o processo de envelhecimento celular e sistêmico. A exposição a fatores estocásticos, como a alimentação adequada e a restrição calórica, e fatores sistêmicos, como (nutri)genéticos e/ou epigenéticos, pode influenciar grandemente não somente a longevidade, como também a qualidade de vida. A seguir serão descritas as principais relações entre nutrigenética, aspectos nutricionais e envelhecimento humano.

RELAÇÕES ENTRE NUTRIGENÉTICA, SISTEMA ANTIOXIDANTE, RESTRIÇÃO CALÓRICA E ENVELHECIMENTO

As respostas fisiológicas de um indivíduo para diferentes condições, desde o metabolismo de nutrientes até o envelhecimento, são moduladas por seus genes. Com o sequenciamento do genoma humano, o número de genes encontrados foi de aproximadamente 25 mil. Entretanto, esse número é considerado baixo, dada a complexidade de fenótipos fisiológicos e patológicos existentes no ser humano. Desse modo, existe a hipótese de que as variações nos padrões de expressão gênica, em vez da expres-

são de genes diferentes, estariam relacionadas à complexidade e à variação de fenótipos em humanos.[25] Além dos diferentes padrões de expressão gênica, existem também as variações genéticas, representadas, principalmente, pelos polimorfismos, os quais incluem segmentos aleatoriamente repetidos, grandes ou pequenas deleções de segmentos gênicos, inserções e duplicações gênicas e polimorfismos de nucleotídeo único (SNP).

Os fatores genéticos contribuem com cerca de 25% para a variação no tempo de vida. Acredita-se que essa contribuição seja mínima antes dos 60 anos e mais importante a partir dos 85 anos de idade.[26] As doenças crônicas do envelhecimento estão fortemente associadas com aumento da taxa metabólica basal, estresse oxidativo, elevação crônica da inflamação de baixo grau, mutações acumuladas e aumento dos níveis de danos no DNA.

A principal fonte de ERO nas células é a mitocôndria. Uma das funções das mitocôndrias no metabolismo celular inclui a fosforilação oxidativa para produção de ATP. Durante a respiração celular, enzimas oxidativas podem estimular a produção de ERO, como moléculas de superóxido ($O_2^{-\cdot}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroxila ($OH^\cdot$). Um estado crônico de estresse oxidativo pode existir nas células em razão do desequilíbrio entre substâncias pró-oxidantes e antioxidantes. O estresse oxidativo aumenta conforme o organismo envelhece e é tido como importante fator causal de envelhecimento.[27] A ingestão alimentar excessiva causa sobrecarga de atividade mitocondrial, a qual está associada a maior produção de ERO. Nesse sentido, a restrição calórica evita ou diminui a produção de ERO, promovendo efeitos positivos em relação à longevidade. A restrição calórica é definida como uma diminuição no consumo de energia abaixo da quantidade de calorias que seria consumida em relação à necessidade energética diária individual estimada, representada por uma redução de 10% em humanos e, geralmente, de 20% em roedores.[28] A descoberta feita por McCay et al.[29] em 1935 – de que a restrição calórica abaixo da quantidade necessária para a manutenção do peso, mas contendo quantidades adequadas de nutrientes essenciais, pode retardar o processo de envelhecimento e marcadamente estender a longevidade – uma das mais importantes descobertas científicas relacionadas com a saúde do século XX.[29] Desde então, centenas de estudos estabeleceram que a restrição calórica retarda o envelhecimento.[30]

A capacidade de estender a vida útil máxima usando a restrição calórica é altamente reprodutível; a extensão do efeito depende do modelo, mas pode atingir aumento de até 60% na longevidade em roedores, nos modelos mais extensivamente estudados.[31] A restrição calórica também mostrou prolongar a longevidade de organismos muito diversos, como leveduras, vermes, moscas, peixes e macacos.[32] Em estudo longitudinal que durou 20 anos, macacos mantidos em restrição calórica tiveram redução (50%) da incidência de mortes relacionadas ao envelhecimento quando comparados ao grupo que se alimentou *ad libitum* (80%). A longevidade foi atribuída a redução de doenças associadas com a idade, incluindo diabete, câncer, doenças cardiovasculares e atrofia cerebral.[33]

Com base em dezenas de estudos realizados em modelos animais ao longo das últimas décadas, o impacto da restrição calórica sobre o processo de envelhecimento e a longevidade foi bem delineado; contudo, os mecanismos moleculares associados aos seus efeitos na longevidade ainda não são completamente compreendidos. Algumas teorias têm sido propostas para explicar os efeitos da restrição calórica na longevidade. Durante a restrição calórica ocorre redução da concentração de glicose no sangue, o que provoca diminuição da produção de insulina pelo pâncreas e, consequentemente, redução do depósito de tecido adiposo, principalmente do tecido adiposo branco.[34] O tecido adiposo branco, além de estocar lipídios, é um órgão endócrino que produz hormônios e adipocitocinas ativos em todo o organismo, como o fator de necrose tumoral (TNF-alfa), a resistina, a adiponectina e a leptina.[35] A diminuição do depósito de tecido adiposo branco pode modificar o padrão de secreção desses hormônios, com liberação de maior quantidade de adiponectina e menor de TNF-alfa e melhora na sensibilidade à insulina em diversos tecidos, como o muscular e o hepático.[36] Essas mudanças metabólicas poderiam atuar favorecendo a longevidade.

Outra hipótese que tenta explicar os efeitos da restrição calórica na longevidade é a da redução da produção de ERO e consequente atenuação dos danos oxidativos. De todo o oxigênio utilizado pelas células na respiração, cerca de 2% dos átomos ficarão apenas parcialmente reduzidos por aceitar um só elétron. As principais ERO resultantes são muito reativas e oxidam parcialmente outras moléculas próximas, como lipídios, proteínas ou ácidos nucleicos, danificando-as. Além disso, as ERO ativam o fator nuclear kappa B (NF-kB), responsável pela transcrição de genes que codificam proteínas com ação pró-inflamatória, como TNF-alfa e interleucinas 1, 2 e 6.[27] Os danos gerados pelo estresse oxidativo, como a ativação da transcrição de genes pró-inflamatórios, estão fortemente relacionados ao envelhecimento e à patogênese de diversas doenças crônicas não transmissíveis, como aterosclerose, diabete tipo 2, alterações neurodegenerativas e câncer. O mecanismo pelo qual a restrição calórica atua na diminuição da formação das ERO ainda não está estabelecido; no entanto, parece atenuar os danos oxidativos por meio da redução da expressão e da ativação do NF-kB. Além disso, a restrição calórica melhora o sistema de reparo do DNA celular.[37]

Outras teorias que tentam explicar a relação entre restrição calórica e longevidade se baseiam na regulação de vias de sinalização celular. Uma das primeiras moléculas de sinalização relacionadas à restrição calórica foi a proteína quinase A (PKA), via AMP cíclico (AMPc). Baixas concentrações de glicose promovidas pela restrição calórica alterariam essa via e teriam efeitos benéficos na longevidade.[38] Outra via de sinalização relacionada à longevidade, primeiramente descrita em leveduras, é a das sirtuínas (SIRT).[39] Em mamíferos, a restrição calórica aumenta as concentrações e a expressão da desacetilase de histonas SIRT1, que apresenta ação biológica relacionada com a atividade de importantes reguladores de transcrição no metabolismo energético, como FOXO1 (*forkhead transcription fator*), receptores ativados por proliferador de peroxissomos alfa e gama (PPAR-alfa e PPAR-gama, respectivamente) e coativador 1 alfa do PPAR-gama (PGC-1alfa).[40] No fígado, a SIRT1 desacetila e ativa a transcrição do PGC-1alfa, o qual interage com FOXO1 que, por sua vez, induz a ativação da gliconeogênese e diminui a glicólise. Nos músculos, a SIRT1 ativa o PGC-1alfa, induzindo a biogênese mitocondrial e aumentando a oxidação de ácidos graxos.[41] No tecido adiposo branco, a SIRT1 reduz a atividade transcricional do PPAR-gama, promovendo o aumento da mobilização de gordura e a diminuição da adipogênese.[42] As SIRT3 e SIRT4 parecem desempenhar papéis importantes no funcionamento da mitocôndria. Na restrição calórica, ocorre a ativação da nicotinamida fosforibosil transferase (NAMPT), que catalisa a síntese de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD). Concentrações elevadas de NAMPT causam o aumento mitocondrial de NAD^+, o que promove a proteção contra o estresse oxidativo e a morte celular.[42] O papel preciso das SIRT na regulação da longevidade ainda não está totalmente elucidado, mas os estudos realizados até o momento apontam para um papel importante dessas moléculas.

A restrição calórica exerce também seus efeitos inibindo a apoptose.[43,44] Nesse contexto, a proteína p53, que atua como fator de transcrição, tem papel notável na regulação da morte celular. Em resposta a sinais de estresse, ela regula seletivamente um conjunto de genes-alvo e desencadeia processos de proteção ao DNA e aos órgãos e tecidos, incluindo parada do ciclo celular, indução da apoptose e/ou senescência, desempenhando, dessa forma, seu papel como supressor tumoral. A descoberta da p53 em organismos que não desenvolvem câncer, como vermes, despertou para outras possíveis funções dessa proteína, incluindo envelhecimento e longevidade em humanos. A diminuição da expressão de p53 promovida pela SIRT1 pode afetar a longevidade por regular negativamente os processos de apoptose celular e senescência replicativa.[45] Outra proteína importante que influencia a apoptose é a FOXO1, codificada pelo gene de mesmo nome (*FOXO1*), o qual tem sua transcrição influenciada pela desacetilação de histonas mediada pela SIRT1, com consequente redução de sua expressão, o que reprime a apoptose.[46] A SIRT1 pode, ainda, desacetilar as histonas do gene que codifica a proteína reparadora de DNA, Ku70, o que faz com que a proteína pró-apoptótica Bax seja inativada, resultando em inibição da apoptose.[47]

Embora essas hipóteses sejam aceitáveis, o papel dos SNP em genes relacionados a enzimas antioxidantes e à restrição calórica também deve ser considerado, pois eles podem ter participação importante no envelhecimento, retardando ou acelerando o processo. Diversos SNP relacionados à restrição calórica, à produção de ERO e ao envelhecimento têm sido descritos. A proteína CEBPA (CCAAT/*enhancer-binding protein alpha*) é um fator de transcrição envolvido no metabolismo lipídico e de glicose e na adipogênese, favorecendo a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos. Carreadores do alelo A em relação ao SNP rs12691 (G>A) no gene *CEBPA* exibem alterações no metabolismo da glicose e menor concentração de colesterola nas lipoproteínas de alta densidade (HDL-c) em comparação com os homozigotos G/G. Estudo demonstrou que a restrição calórica é capaz de reduzir a expressão de *CEBPA* em pacientes com síndrome metabólica e que tais efeitos estão relacionados ao SNP rs12691.[48]

O gene *PPARG* também é influenciado pela restrição calórica. Um estudo realizado com 95 mulheres japonesas que receberam alimentação nutricionalmente equilibrada durante 14 semanas, mas com restrição calórica (1.200 kcal/dia), mostrou que seis SNP do gene *PPARG* (rs2959272, rs1386835, rs709158, rs1175540, rs1175544 e rs1797912) foram significativamente associados com a redução de peso, sendo o rs1175544 o que apresentou a associação mais forte.[49]

Os SNP rs4880 (47T>C, Val16Ala) e rs1050450 (593C>T, Pro198Leu), relacionados aos genes que codificam as enzimas superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD) e glutationa peroxidase 1 (GPx1), respectivamente, estão associados com doenças relacionadas à idade, como câncer e doenças cardiovasculares, e parecem influenciar as atividades das proteínas codificadas. Um estudo realizado por Soerensen et al.[26] genotipou os SNP em 1.650 indivíduos com idades de 92 a 93 anos, pertencentes a uma coorte dinamarquesa iniciada em 1905, e investigou a associação destes com o envelhecimento e a longevidade. Os resultados do estudo mostraram diminuição da mortalidade entre indivíduos que carreavam o alelo C referente ao SNP MnSOD rs4880 ou o alelo T em relação ao polimorfismo GPx1 rs1050450. Além disso, o estudo verificou efeito sinérgico dos alelos

variantes, ou seja, a presença de ambos foi mais eficaz para a longevidade, demonstrando que SNP relacionados à MnSOD e à GPx1 podem estar associados ao envelhecimento e à longevidade.

Os habitantes de Okinawa, no Japão, são de especial interesse em relação a nutrigenética e envelhecimento, pois representam a população com maior longevidade no mundo. O perfil de doenças crônicas da população de idosos de Okinawa é impressionante, com mortalidade 80% e 40% inferior por doenças coronarianas e câncer, respectivamente, em comparação à população dos Estados Unidos.[50] O fenômeno do envelhecimento saudável em Okinawa pode ser atribuído aos fatores nutricionais e à restrição calórica. Além da restrição calórica, as propriedades de determinados alimentos da alimentação tradicional de Okinawa estão recebendo cada vez mais atenção, pois vários desses alimentos podem mimetizar os efeitos biológicos da restrição calórica.[51] Os itens populares no padrão alimentar de Okinawa que podem ser considerados miméticos da restrição calórica são batata-doce (polpa, pele e folhas), melão amargo, açafrão, gengibre, artemísia (*Artemisia vulgaris*), pimentão (*Piper hancei*) e alimentos marinhos ricos em carotenoides. O clima em Okinawa parece também ter efeito importante. Os compostos miméticos de restrição calórica são sintetizados pelas plantas para auxiliar no combate aos radicais livres formados em razão dos extremos de calor, frio ou luz ultravioleta. Como o sol em Okinawa é particularmente forte, muitas plantas cultivadas localmente contêm altas quantidades desses compostos bioativos.[52]

Pesquisas recentes identificaram possíveis mecanismos biológicos pelos quais a restrição calórica e seus miméticos podem agir em seres humanos.[53] Uma das vias mais promissoras é a de sinalização da insulina-fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1). O *FOXO3* é um importante gene regulador da via insulina-IGF-1. Ele atua como fator de transcrição que induz alterações na expressão de muitos genes-alvo em resposta ao estresse biológico e é regulado positivamente pela restrição calórica e seus miméticos, o que aumenta a resistência ao estresse e impacta positivamente na longevidade.

EPIGENÉTICA E ENVELHECIMENTO

Além dos fatores até aqui descritos, outros aspectos também influenciam o envelhecimento. A sequência de nucleotídeos no DNA genômico, a qual forma o conjunto de genes do ser humano, não é a única informação genética nas células. Informações estáveis que não envolvem mudanças na sequência de nucleotídeos do DNA e que são transmitidas às células-filhas também contribuem para a passagem de informação durante a divisão celular e são denominadas marcas epigenéticas. O termo *epigenética* refere-se ao estudo dessas alterações estáveis na expressão gênica, as quais são influenciadas por fatores ambientais ou externos ao organismo, como o estilo de vida e a alimentação. Os eventos epigenéticos podem se referir ao padrão de metilação do DNA; às modificações em histonas, incluindo metilação, acetilação e fosforilação, o que influencia as modificações estruturais da cromatina; e à regulação da tradução mediada por microRNA.[54]

Evidências sugerem que as alterações do padrão de metilação do DNA em *loci* gênicos específicos podem desempenhar papel essencial na longevidade promovida pela restrição calórica.[55] A metilação do DNA é uma das mais importantes modificações epigenéticas e ocorre, principalmente, em resíduos dinucleotídicos de citosina e guanina (CpG), os quais são frequentemente agrupados em ilhas nos sítios regulatórios de promotores gênicos. Em geral, a quantidade de metilação de uma sequência de DNA está inversamente correlacionada com a ativação desse gene.[56] Os grupos metil nos dinucleotídeos CpG podem recrutar várias proteínas do complexo de transcrição, incluindo fatores de transcrição sensíveis à metilação e proteínas de ligação responsivas a grupos metil que estão frequentemente associadas com silenciamento gênico.[57] Portanto, fatores epigenéticos, como a metilação do DNA, desempenham papel importante na regulação da expressão gênica, na manutenção da integridade e estabilidade do DNA em muitos processos biológicos, como no desenvolvimento normal e no envelhecimento.

Durante o processo de envelhecimento, há perda progressiva da capacidade de homeostasia e perda da integridade da cromatina, predominantemente em consequência de padrões de expressão gênica alterados.[58] Uma vez que a restrição calórica induz uma série de respostas metabólicas, a regulação eficaz dos processos metabólicos para se adaptar a essa mudança poderia ser outro importante mecanismo subjacente ao efeito da ingestão reduzida de calorias sobre a longevidade. Intervenções de restrição calórica em seres humanos obesos revelaram que dietas hipocalóricas provocam alterações no padrão de metilação do DNA em genes específicos, como *ATP10A*, *WT1* e *TNFA,* as quais poderiam ser utilizadas como indicadoras precoces de resposta aos efeitos metabólicos e como preditoras de resultados em programas de redução de peso.[59]

As modificações em histonas são outro exemplo de alterações epigenéticas que podem ocorrer em resposta à restrição calórica. Essas modificações afetam a estrutura básica da cromatina, o nucleossomo, o qual consiste em 146 pares de bases de DNA enrolado em torno de um octâmero de histonas, ou seja, quatro pares das histonas H2A, H2B, H3 e H4.[60] Na maioria dos casos, mudanças como acetilação, metilação, ubiquitinação e ribosilação

de ADP ocorrem no grupo N-terminal de resíduos de lisinas nas histonas, mas as principais alterações epigenéticas nessas proteínas são acetilação e desacetilação. Tais modificações estão associadas tanto com a ativação quanto com a repressão da transcrição gênica. A combinação de modificações nas histonas altera a configuração do nucleossomo para um estado de cromatina mais ou menos relaxada, o que pode determinar o seu nível de compactação e, assim, o grau de atividade transcricional do gene.[61]

Enzimas que promovem a desacetilação de histonas são chamadas de histonas desacetilases (HDAC). Relatou-se que a atividade de HDAC aumentou durante experimentos de restrição calórica, sugerindo que a desacetilação global pode ser um mecanismo de proteção contra modificações nutricionais prejudiciais que influencia o processo de envelhecimento.[62] Em locais com alta atividade de HDAC1, como nas regiões promotoras dos genes que codificam a $p16^{INK4a}$ e a transcriptase inversa da telomerase humana (hTERT), a qual é um fator determinante da atividade da telomerase e está intimamente relacionada com a regulação do envelhecimento, a maior expressão desses dois genes parece contribuir para a longevidade em condições de restrição calórica.[63]

A SIRT1, já citada anteriormente, é uma proteína da família das HDAC que tem importante papel na longevidade induzida por restrição calórica.[64-67] A SIRT1 humana mantém o silenciamento da cromatina, desacetilando as histonas 3 e 4 (H3 e H4) nos resíduos de lisina 16 e 9, respectivamente. Entretanto, ela não desacetila somente histonas, mas uma variedade de substratos, como fatores de transcrição e proteínas regulatórias envolvidas em múltiplas vias relacionadas a processos fisiológicos e metabólicos que contribuem para a longevidade via restrição calórica.[43,44]

Enzimas que promovem a metilação de histonas também estão envolvidas em alterações epigenéticas e influenciam a expressão gênica.[68] Em contraste com a acetilação de histonas, que está sempre associada a um estado relaxado ou aberto da cromatina e à subsequente ativação gênica, a metilação de histonas apresenta padrões de associação com proteínas específicas, as quais reconhecem essa marcação e, assim, promovem tanto o silenciamento quanto a ativação gênica. Resíduos de lisina nas histonas podem ser mono, di ou trimetilados e a ativação ou repressão depende do resíduo de lisina particular que é modificado.[69] Estudos demonstram que as modificações de metilação em histonas também podem regular o envelhecimento pela ativação da transcrição de genes que codificam as proteínas $p16^{INK4a}$ e hTERT, contribuindo assim para a longevidade promovida pela restrição calórica em células humanas.[62] A Figura 33.1 resume os efeitos sistêmicos da restrição calórica.

As vias reguladas por mecanismos epigenéticos que podem ser responsáveis pela longevidade induzida pela restrição calórica ainda são pouco conhecidas. Novas investigações nessa área em particular podem resultar em perspectivas promissoras no desenvolvimento de abordagens clínicas preventivas ou terapêuticas para doenças degenerativas relacionadas à idade.

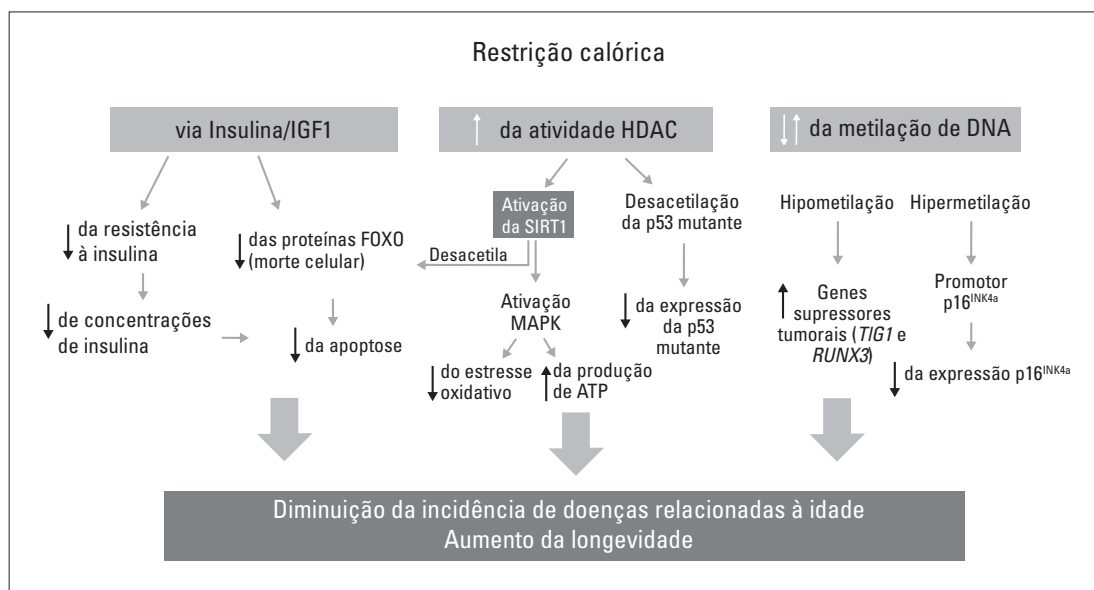



Figura 33.1 Efeitos da restrição calórica sobre a redução de doenças relacionadas com a idade e aumento da longevidade. ATP: trifosfato de adenosina; FOXO: *forkhead transcription factor*, HDAC: desacetilase de histona; IGF-1: *insulin-like growth factor 1*; MAPK: *mitogen-activated protein kinases*; SIRT1: sirtuína 1. **Fonte:** adaptada de Daniel e Tollefsbol.[43]

INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL NA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA NO ENVELHECIMENTO

Atualmente, existe grande preocupação com a alimentação saudável e com a busca de diferentes estratégias que possam atuar no combate ao envelhecimento e na redução do risco de doenças. Estudos evidenciam que alguns compostos bioativos de alimentos (CBA) apresentam potencial para a redução do risco de doenças crônicas relacionadas ao envelhecimento, embora tais compostos não sejam considerados nutrientes essenciais. Em sua maioria, os CBA são metabólitos secundários de plantas, os quais estão presentes em grande variedade de alimentos, incluindo frutas, legumes, cereais, nozes e cacau, bem como em bebidas como sucos, chás, café e vinho.[70]

Há três principais categorias de CBA: polifenóis, glicosinolatos e carotenoides. Cada categoria de CBA apresenta subgrupos; os polifenóis, por exemplo, dividem-se em flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos e lignanas. Os flavanóis do chá, as isoflavonas da soja, as antocianinas das frutas vermelhas e o resveratrol da uva encontram-se na categoria dos flavonoides.[71]

A seguir será feita uma breve descrição de estudos relatados na literatura acerca da relação entre os principais CBA e sua atuação como moléculas antienvelhecimento por meio da modulação da expressão gênica.

Resveratrol

Esta molécula é um pequeno polifenol encontrado em uvas, vinho tinto, amêndoas, frutas vermelhas, cacau e no heléboro, uma planta da família das Ranunculaceas, nativas da Europa e Ásia.[72] Um estudo pioneiro realizado em 1992 mostrou o paradoxo epidemiológico de que os franceses, mesmo consumindo alimentação rica em gordura saturada e vinho tinto, apresentavam menor incidência de doenças coronarianas e maior longevidade, embora esteja bem estabelecido que a ingestão frequente de gordura saturada está associada à alta incidência de doenças cardíacas. Esse estudo deu origem, mais tarde, ao termo *paradoxo francês*.[73] Assim, a descoberta de que o vinho tinto contém quantidade significativa de resveratrol[74] e os resultados da pesquisa com indivíduos franceses atraíram o interesse da comunidade científica e vários trabalhos sobre os benefícios do resveratrol na saúde foram publicados.[75] Alguns estudos clínicos estão sendo realizados na tentativa de comprovar definitivamente a atuação do resveratrol como substância antienvelhecimento, anti-inflamatória, antioxidante e antitumoral.[76]

O resveratrol proveniente do vinho tinto inibe a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL),[77-79] importantes no desenvolvimento de doenças coronarianas. Por sua função antioxidante, o resveratrol parece ter ações positivas na redução do risco de diabete,[80,81] de alguns tipos de câncer[82] e da doença de Alzheimer.[83] Demonstrou-se, ainda, que o resveratrol parece mimetizar alguns efeitos da restrição calórica, melhorando a saúde e prolongando a vida útil em leveduras,[84] *Drosophila melanogaster*[85] e *Caenorhabditis elegans*,[86] todos modelos clássicos no estudo do envelhecimento.

Estudos utilizando camundongos também demonstraram que a ingestão de quantidades moderadas de resveratrol promoveu aumento da expectativa de vida de animais obesos alimentados com alto teor de lipídios em 26% (0,01% de resveratrol na dieta) e em 25% (0,04% de resveratrol na dieta) dos casos.[87] De maneira intrigante, contudo, ao contrário de camundongos alimentados com alto teor de lipídios, entre os alimentados com dieta padrão, aqueles que receberam o tratamento com resveratrol em longo prazo (0,01% ou 0,04%) não tiveram sua longevidade aumentada.[88] Esses resultados podem indicar que a promoção de sobrevivência e longevidade em camundongos alimentados com alto teor de lipídios seja uma ação secundária do resveratrol, modulando favoravelmente as alterações fisiológicas e metabólicas promovidas pela obesidade nos principais órgãos e tecidos, o que, sem a ação do resveratrol, poderia levar gradualmente à patogênese de várias doenças crônicas.

De fato, o tratamento com resveratrol melhorou parâmetros como resistência à insulina, estresse oxidativo, inflamação, disfunção vascular, osteoporose, catarata e a diminuição da coordenação motora em camundongos idosos alimentados com ração hiperlipídica. O resveratrol também reduziu o número de mortes causadas por esteatose hepática combinada com congestão severa e edema pulmonar, os quais podem ser parcialmente atribuídos a uma alimentação rica em gordura.[88]

Em humanos, ainda não existem evidências sólidas de que a ingestão de resveratrol possa aumentar a longevidade. Entretanto, resultados de estudos de curta duração apontaram que o resveratrol melhorou a resistência à insulina, o fluxo de sangue e os eventos cardiovasculares, bem como diminuiu o estresse oxidativo e a inflamação em indivíduos saudáveis com peso normal.[89-91] Esses resultados podem apontar para uma ação antienvelhecimento promissora desse composto, uma vez que as doenças cardiovasculares representam uma das principais causas de morbidade e mortalidade relacionadas com o envelhecimento humano.

Os mecanismos de ação envolvidos na atividade do resveratrol como molécula antienvelhecimento são certamente muito complexos e envolvem a mudança de padrões de expressão gênica, com consequente influência

em várias vias de sinalização. Já discutiu-se anteriormente sobre as SIRT, seu papel no metabolismo de glicose e insulina e como essas moléculas podem ser moduladas pela restrição calórica. O resveratrol também parece agir modulando a expressão dos genes *Sirt1*,[92] *Sirt3*, *Sirt4* e *Nampt*, em modelos de peixes,[93] simulando assim os efeitos da restrição calórica. A ativação da SIRT3 pelo resveratrol aumenta a secreção de insulina ou melhora a sensibilidade a este hormônio em tecidos periféricos.[94] Estudos recentes descreveram a capacidade das células alfa pancreáticas de se diferenciarem em células produtoras de insulina após a perda de células beta. Em camundongos, o resveratrol induziu a expressão de genes como *Pdx1* e *Ins2*, de forma dependente de SIRT1 em células alfa pancreáticas.[95]

O gene *KL*, que em humanos codifica a enzima klotho, parece agir aumentando a longevidade.[96] Camundongos *knockout* para esse gene desenvolveram fenótipos de envelhecimento acelerado, incluindo baixo tempo de vida, atrofia da pele, osteopenia, arteriosclerose, hiperfosfatemia, calcificação vascular, enfisema pulmonar, marcha parkinsoniana e comprometimento cognitivo.[97] O gene *KL* codifica duas isoformas de proteína, uma transmembrana e outra solúvel. Esta última modula várias vias de sinalização envolvidas na regulação da longevidade, incluindo a da insulina e do IGF-1, do Wnt, do fator de transformação de crescimento beta 1 (TGF-beta1) e vias de sinalização envolvidas no estresse oxidativo.[98] Estudo com células epiteliais renais de camundongos C57BL/6 revelou que o resveratrol aumenta a expressão renal de *Kl* por meio do complexo ATF3/c-Jun (*activation transcriptor factor 3/c-Jun*), o que explica, pelo menos em parte, as propriedades antienvelhecimento do resveratrol.[99] Também se demonstrou que o resveratrol ameniza a dislipidemia e a esteatose induzidas por dieta aterogênica em camundongos, e seus efeitos benéficos foram associados com a expressão alterada de genes hepáticos envolvidos no metabolismo lipídico.[100]

Em cultura de macrófagos RAW 264.7 ativados com lipopolissacarídeos (LPS), foram demonstradas também importantes ações anti-inflamatórias do resveratrol, por meio da modulação da expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS), tanto em nível de RNA mensageiro como de proteína. Além disso, a ativação do NF-kB pelo LPS foi inibida pelo resveratrol, principalmente por meio da inibição da fosforilação do inibidor de kb (IkB) ou pela inibição de sua degradação.[101]

Considerados em conjunto, esses estudos demonstram, pelo menos em parte, os mecanismos pelos quais o resveratrol atua favorecendo a longevidade; porém, mais estudos devem ser realizados, principalmente em humanos, para que o papel desse polifenol na diminuição da incidência de doenças crônicas do envelhecimento e no aumento de longevidade possa ser mais bem esclarecido.

Catequinas

As catequinas são flavanóis que podem ser encontrados em maçãs, frutas vermelhas, chocolate, uvas, peras e chás. No entanto, grãos de cacau têm as mais altas concentrações de epicatequina (43,3 g/kg), muito mais que a segunda maior fonte, o chá-verde (8 g/kg).[102,103] Estudos epidemiológicos indicam que pessoas que consomem grandes quantidades de cacau diariamente apresentam incidências menores de doença isquêmica do coração, acidente vascular encefálico, diabete e maior longevidade em comparação com pessoas que têm alimentação pobre em cacau.[104-106] Embora os mecanismos subjacentes aos efeitos benéficos ainda não estejam totalmente esclarecidos, é provável que a ingestão de cacau ou de chocolate rico em cacau possa melhorar a função dos vasos sanguíneos, a sensibilidade à insulina, a pressão sanguínea e a inflamação.[107]

As epicatequinas parecem ter efeito protetor sobre as células beta pancreáticas em ratos tratados com estreptozotocina, uma droga tóxica para essas células e que induz ao diabete. Em resposta a essa doença, são liberadas citocinas pró-inflamatórias que infiltram em torno das ilhotas pancreáticas. Especificamente, a interleucina-1 beta (IL-1beta) estimula a iNOS e a superprodução de óxido nítrico, causando danos às células beta. Na ativação dessa via, o NF-kB desempenha papel crucial e muitos dos genes sensíveis à IL-1beta contêm sítios de ligação ao NF-kB nas suas regiões promotoras. Estudo mostrou que a epicatequina inibiu a expressão da iNOS induzida por IL-1beta por meio da diminuição da expressão e da ativação do NF-kB.[108]

Em estudo *in vitro* de genômica funcional, no qual células tumorais humanas da linhagem Caco-2 foram tratadas com epicatequina, 21 genes tiveram sua expressão diminuída e 24, aumentada, em comparação com as células não tratadas. Os principais genes alterados estavam relacionados ao sistema antioxidante ou à resposta anti-inflamatória.[109] A epicatequina inibiu, ainda, a ativação de vias de sinalização relacionadas à inflamação e à resistência à insulina, desencadeadas pelo TNF-alfa em adipócitos,[110] além de proteger contra o estresse oxidativo em células endoteliais.[111] *In vivo*, a epicatequina demonstrou efeitos anti-inflamatórios e antiaterogênicos em camundongos.[112]

O chá é a bebida mais consumida no mundo, depois da água. O extrato de chá-verde é um suplemento alimentar que tem sido extensamente utilizado em virtude de seus prováveis efeitos benéficos sobre doenças cardiovas-

culares,[113] câncer,[114] diabete,[115] obesidade[116] e doenças neurodegenerativas.[117] O principal componente bioativo presente no extrato de chá-verde é a epigalocatequina-3-galato (EGCG).

Estudos realizados em *D. melanogaster* mostraram que esse extrato reduziu a mortalidade induzida por dieta rica em lipídios.[118] A EGCG aumentou a vida útil de *C. elegans* mantidos em condições normais ou de estresse oxidativo.[119] O extrato de chá-verde também prolongou a vida de camundongos da linhagem C57BL/6 em 51 dias. Os animais receberam água contendo 80 mg/L do extrato a partir de 13 meses de idade até sua morte.[120] Nessa mesma linhagem de camundongos, uma ração suplementada com mistura de 2% de extrato de mirtilo, 0,0115% de EGCG e 0,3% de romã em pó aumentou a longevidade induzida por restrição calórica.[121]

No entanto, estudo recente do Instituto Nacional do Envelhecimento Americano relatou que o tratamento ao longo da vida de camundongos machos e fêmeas geneticamente heterogêneos, iniciando aos quatro meses de idade, com 2% de extrato de chá-verde, não estendeu significativamente sua vida útil, porém diminuiu o risco de morte em fêmeas.[122] Portanto, o efeito antienvelhecimento do extrato de chá-verde pode depender de características genéticas ou da presença de fatores ambientais específicos, como modificações nos padrões alimentares. Além disso, a dose, a duração e a idade em que a intervenção é iniciada podem afetar os resultados. Os estudos que avaliam a ação antienvelhecimento do chá-verde em humanos são raros, porém um estudo de coorte mostrou que a rotina de beber chá-verde reduziu significativamente a taxa de mortalidade em mulheres japonesas.[123]

A Figura 33.2 resume os fatores pró-envelhecimento descritos neste capítulo, os quais estão relacionados às teorias do envelhecimento, além dos fatores antienvelhecimento, que atuam favorecendo a longevidade.

Quercetina

A quercetina é um flavonoide abundante em muitas frutas e hortaliças, incluindo uvas, frutas vermelhas, cebolas, maçãs e brócolis.[124] O gene *DAF2* (ou *AGE1*) codifica o receptor de IGF-1 em *C. elegans*. Ambos, gene e receptor, são fundamentais na via metabólica que regula a taxa de envelhecimento dessa espécie. Uma mutação recessiva nesse gene aboliu o efeito da quercetina na longevidade, sugerindo que esse composto fenólico pode atuar direta ou indiretamente nas vias de sinalização mediadas pelo *DAF2*.[125] A quercetina também atuou aumentando a vida útil de fibroblastos senescentes, via ativação do complexo proteassoma, a principal maquinaria proteolítica celular responsável pela degradação de proteínas normais e danificadas. As atividades e funções do proteassoma estão diminuídas na senescência replicativa, enquanto sua ativação confere proteção contra o estresse oxidativo, aumentando a longevidade em fibroblastos humanos.[126]

Figura 33.2 Fatores pró-envelhecimento, relacionados às teorias do envelhecimento, e fatores antienvelhecimento, relacionados ao aumento da longevidade.

A quercetina é considerada como um antioxidante potente com mais de seis vezes a capacidade antioxidante da vitamina C.[127] Além disso, a quercetina também regula a expressão de genes que codificam proteínas com ação anti-inflamatória, inibindo a produção induzida por LPS das citocinas IL-1alfa e TNF-alfa em células do sistema imune.[128] A quercetina também agiu como anti-inflamatória em cultura de células mononucleares humanas por inibição do TNF-alfa[129] e aumentou de forma significativa a expressão de Mn-SOD em fígado de ratos após lesão por obstrução uretral ou isquemia.[130] Em um modelo similar, também atuou de maneira antioxidante e antiapoptótica, inibindo a expressão da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e do NF-kB, o que protegeu o tecido renal de ratos da lesão provocada por isquemia e reperfusão.[131]

A quercetina tem efeito antiaterogênico em ratos, promovendo o aumento da expressão do gene que codifica a paraoxonase 1 (PON1) e de sua capacidade de proteção contra a oxidação da LDL. A PON1 protege a LDL das modificações oxidativas e é um dos principais componentes proteicos da HDL.[132] Ainda, um extrato de pele de cebola rico em quercetina diminuiu a expressão dos genes adipogênicos *Pparg*, *Cebpa* (proteína de ligação potencializadora CCAAT), *Fabp4* (proteína de ligação a ácidos graxos 4), *Ap2* (proteína ativadora 2) e *Lpl* (lipase de lipoproteína) em adipócitos da linhagem 3T3-L1 de camundongos.[133]

Com base nos dados relatados, pode-se concluir que os mecanismos moleculares pelos quais a quercetina atua parecem estar principalmente ligados ao metabolismo lipídico e aos sistemas antioxidante e imunológico, caracterizando-a como molécula anti-inflamatória, antioxidante e antiadipogênica.

Curcumina

A curcumina é um composto fenólico presente em várias espécies de plantas, incluindo a *Curcuma longa*, raiz a partir da qual é produzida a cúrcuma.[134] É utilizada há séculos na medicina tradicional chinesa e indiana como tratamento para vários distúrbios, incluindo dor de estômago, flatulência, disenteria, úlceras, icterícia, artrite, entorses, feridas, acne e infecções dos olhos.[135] A ingestão de curcumina é considerada segura e tem sido amplamente estudada por seus potenciais efeitos benéficos sobre a saúde. Já foi demonstrado que a suplementação com curcumina prolonga a vida em *D. melanogaster*,[136,137] em *C. elegans*[138] e em camundongos.[120] Além disso, a ingestão de curcumina e piperina, um alcaloide presente na pimenta-preta, atuou sinergisticamente atenuando a senescência induzida por D-galactose em ratos.[139]

Os efeitos da curcumina no aumento da longevidade podem ser explicados por suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes. Em resumo, tem-se demonstrado que a curcumina atua reduzindo a expressão de mediadores celulares importantes, como NF-kB, ciclo-oxigenase 2 (COX-2), lipoxigenase e iNOS.[140] O NF-kB desempenha papel crítico em diversas vias de sinalização envolvidas em doenças inflamatórias crônicas, como asma, artrite reumatoide e vários tipos de câncer.[141] A COX-2 é uma enzima induzível e quase indetectável em condições fisiológicas normais. Ela é transitoriamente induzida como resposta precoce aos mediadores inflamatórios e aos estímulos mitogênicos, incluindo citocinas, endotoxinas, fatores de crescimento, oncogenes e ésteres de forbol. A iNOS desempenha papel fundamental na mediação da inflamação, é ativada pelo NF-kB e age em sinergia com a COX-2 para promover a reação inflamatória.[140]

A curcumina regula também a expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF-alfa e IL-1), fatores de crescimento (VEGF, EGF e FGF), receptores de fatores de crescimento (EGFR, HER-2 e AR), enzimas (inibidores da COX-2, LOX, MMP9, MAPK, mTOR e Akt), moléculas de adesão (ELAM-1, ICAM-1 e VCAM-1), moléculas relacionadas à apoptose (Bcl-2, caspases, DR e Fas) e proteínas do ciclo celular (ciclina D1), além de modular a atividade de vários fatores de transcrição (NF-kB, AP-1 e STAT) e suas vias de sinalização. Com base na sua capacidade para afetar múltiplos alvos, a curcumina tem potencial na redução do risco e no tratamento de várias doenças, incluindo câncer, artrite, alergias, aterosclerose, envelhecimento, doenças neurodegenerativas e hepáticas, obesidade, diabete, psoríase e doenças autoimunes.[142]

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando que o envelhecimento é um fenômeno mundial que vem se acentuando nas últimas décadas, é importante entender suas bases biológicas e moleculares, bem como a influência dos padrões de expressão gênica e de polimorfismos genéticos nas várias facetas desse fenômeno. É de grande importância o entendimento da influência dos padrões de suplementação alimentar na longevidade. Diante do exposto neste capítulo, pode-se concluir que, apesar da enorme quantidade de teorias estocásticas e sistêmicas que explicam o envelhecimento, os mecanismos biológicos e moleculares que permeiam tais teorias ainda necessitam ser mais bem investigados, de modo a contribuir para sua elucidação. Entretanto, os vários estudos citados neste capítulo demonstram o importante papel da genômica nutricional tanto em relação aos padrões de expressão gênica quanto às variações genéticas e a influência dos padrões alimentares na longevi-

dade. Ainda assim, mais estudos devem ser realizados, especialmente em coortes com seres humanos, para que os mecanismos biológicos e moleculares subjacentes ao envelhecimento possam ser elucidados por completo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. [WHO] World Health Organization, US National Institute of Aging. Global healht and aging. Geneva: WHO; 2011. 32p.
2. Mathers CD, Stevens GA, Boerma T, White RA, Tobias MI. Causes of international increases in older age life expectancy. Lancet. 2014;385:540-8.
3. Nicholls P. Senescence and senility. Nature. 1962;194:506-8.
4. Cefalu CA. Theories and mechanisms of aging. Clin Geriatr Med. 2011;27(4):491-506.
5. Freitas E, Py L, Doll J, Gorzoni MLC. Tratado de geriatria e gerontologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2011.
6. Moskalev AA, Aliper AM, Smit-McBride Z, Buzdin A, Zhavoronkov A. Genetics and epigenetics of aging and longevity. Cell Cycle. 2014;13(7):1063-77.
7. Luevano-Contreras C, Chapman-Novakofski K. Dietary advanced glycation end products and aging. Nutrients. 2010;2(12):1247-65.
8. Grillo MA, Colombatto S. Advanced glycation end-products (AGEs): involvement in aging and in neurodegenerative diseases. Amino Acids. 2008;35(1):29-36.
9. Ono T, Uehara Y, Saito Y, Ikehata H. Mutation theory of aging, assessed in transgenic mice and knockout mice. Mech Ageing Dev. 2002;123(12):1543-52.
10. Harman D. Role of free radicals in aging and disease. Ann NY Acad Sci. 1992;673:126-41.
11. Campos PB, Paulsen BS, Rehen SK. Accelerating neuronal aging in in vitro model brain disorders: a focus on reactive oxygen species. Front Aging Neurosci. 2014;6:292.
12. Sullivan LB, Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. Cancer Metab. 2014;2:17.
13. Hulsmans M, van Dooren E, Holvoet P. Mitochondrial reactive oxygen species and risk of atherosclerosis. Curr Atheroscler Rep. 2012;14(3):264-76.
14. Puddu P, Puddu GM, Cravero E, Rosati M, Muscari A. The molecular sources of reactive oxygen species in hypertension. Blood Press. 2008;17(2):70-7.
15. Gomez DE, Armando RG, Farina HG, Menna PL, Cerrudo CS, Ghiringhelli PD et al. Telomere structure and telomerase in health and disease (review). Int J Oncol. 2012;41(5):1561-9.
16. Hacker KJ, Alberts BM. The rapid dissociation of the T4 DNA polymerase holoenzyme when stopped by a DNA hairpin helix. A model for polymerase release following the termination of each Okazaki fragment. J Biol Chem. 1994;269(39):24221-28.
17. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. Exp Cell Res. 1961;25:585-621.
18. Juckett DA. Cellular aging (the Hayflick limit) and species longevity: a unification model based on clonal succession. Mech Ageing Dev. 1987;38(1):49-71.
19. Bernardes de Jesus B, Blasco MA. Telomerase at the intersection of cancer and aging. Trends Genet. 2013;29(9):513-20.
20. Xi H, Li C, Ren F, Zhang H, Zhang L. Telomere, aging and age-related diseases. Aging Clin Exp Res. 2013;25(2):139-46.
21. Tumpel S, Rudolph KL. The role of telomere shortening in somatic stem cells and tissue aging: lessons from telomerase model systems. Ann NY Acad Sci. 2012;1266:28-39.
22. Nakamura TM, Cech TR. Reversing time: origin of telomerase. Cell. 1998;92(5):587-90.
23. Varela E, Blasco MA. 2009 nobel prize in physiology or medicine: telomeres and telomerase. Oncogene. 2010;29(11):1561-5.
24. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. Nature. 2000;407(6805):770-6.
25. Morley M, Molony CM, Weber TM, Devlin JL, Ewens KG, Spielman RS et al. Genetic analysis of genome-wide variation in human gene expression. Nature. 2004;430(7001):743-7.
26. Soerensen M, Christensen K, Stevnsner T, Christiansen L. The Mn-superoxide dismutase single nucleotide polymorphism rs4880 and the glutathione peroxidase 1 single nucleotide polymorphism rs1050450 are associated with aging and longevity in the oldest old. Mech Ageing Dev. 2009;130(5):308-14.
27. Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. Science. 1996;273(5271):59-63.
28. Bales CW, Kraus WE. Caloric restriction: implications for human cardiometabolic health. J Cardiopulm Rehabil Prev. 2013;33(4):201-8.
29. McCay CM, Crowell MF, Maynard LA. The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. 1935. Nutrition. 1989;5(3):155-71; discussion 172.
30. Dabhade PM, Kotwal S. Tackling the aging process with bio-molecules: a possible role for caloric restriction, food-derived nutrients, vitamins, amino acids, peptides, and minerals. J Nutr Gerontol Geriatr. 2013;32(1):24-40.
31. Fontana L. Calorie restriction and cardiometabolic health. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil. 2008;15(1):3-9.
32. Cruzen C, Colman RJ. Effects of caloric restriction on cardiovascular aging in non-human primates and humans. Clin Geriatr Med. 2009;25(4):733-43, ix-x.
33. Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman KC, Kosmatka KJ, Beasley TM et al. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. Science. 2009;325(5937):201-4.
34. Koubova J, Guarente L. How does calorie restriction work? Gene Develop. 2003;17(3):313-21.
35. Bjorntorp P. Metabolic implications of body fat distribution. Diabetes Care. 1991;14(12):1132-43.
36. Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Klebanov S, Iyengar P, Jimenez-Chillaron JC et al. Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. Diabetes. 2003;52(2):268-76.
37. Yu BP. Why calorie restriction would work for human longevity. Biogerontology. 2006;7(3):179-82.
38. Thevelein JM, Winde JH. Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Molecular Microbiology. 1999;33(5):904-18.
39. Landry J, Sutton A, Tafrov ST, Heller RC, Stebbins J, Pillus L et al. The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. Proc Natl Acad Sci USA. 2000;97(11):5807-11.
40. Bordone L, Guarente L. Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. Nat Rev Mol Cell Biol. 2005;6(4):298-305.
41. Haigis MC, Guarente LP. Mammalian sirtuins-emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. Genes Dev. 2006;20(21):2913-21.
42. Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado de Oliveira R et al. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. Nature. 2004;429(6993):771-6.

43. Daniel M, Tollefsbol TO. Epigenetic linkage of aging, cancer and nutrition. J Exp Biol. 2015;218(Pt 1):59-70.
44. Li Y, Daniel M, Tollefsbol TO. Epigenetic regulation of caloric restriction in aging. BMC Med. 2011;9:98.
45. Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. Cell. 2001;107(2):137-48.
46. Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y et al. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. Science. 2004;303(5666):2011-5.
47. Jeong J, Juhn K, Lee H, Kim SH, Min BH, Lee KM et al. SIRT1 promotes DNA repair activity and deacetylation of Ku70. Exp Mol Med. 2007;39(1):8-13.
48. Bennett CE, Nsengimana J, Bostock JA, Cymbalista C, Futers TS, Knight BL. CCAAT/enhancer binding protein alpha, beta and delta gene variants: associations with obesity related phenotypes in the Leeds Family Study. Diab Vasc Dis Res. 2010;7(3):195-203.
49. Matsuo T, Nakata Y, Katayama Y, Iemitsu M, Maeda S, Okura T. PPARgama genotype accounts for part of individual variation in body weight reduction in response to calorie restriction. Obesity (Silver Spring). 2009;17(10):1924-31.
50. Willcox BJ, Willcox DC, Todoriki H, Fujiyoshi A, Yano K, He Q et al. Caloric restriction, the traditional Okinawan diet, and healthy aging: the diet of the world's longest-lived people and its potential impact on morbidity and life span. Ann NY Acad Sci. 2007;1114:434-55.
51. Davinelli S, Willcox SC, Scapagnini G. Extending healthy ageing: nutrient sensitive pathway and centenarian population. Immun Ageing. 2012;9:9.
52. Murakami A, Ishida H, Kobo K, Furukawa I, Ikeda Y, Yonaha M et al. Suppressive effects of Okinawan food items on free radical generation from stimulated leukocytes and identification of some active constituents: implications for the prevention of inflammation-associated carcinogenesis. Asian Pac J Cancer Prev. 2005;6(4):437-48.
53.Willcox BJ, Willcox DC. Caloric restriction, caloric restriction mimetics, and healthy aging in Okinawa: controversies and clinical implications. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2014;17(1):51-8.
54. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. Nature Genetics. 2003;33:245-54.
55. Hass BS, Hart RW, Lu MH, Lyn-Cook BD. Effects of caloric restriction in animals on cellular function, oncogene expression, and DNA methylation in vitro. Mutat Res. 1993;295(4-6):281-9.
56. Razin A, Riggs AD. DNA methylation and gene function. Science. 1980;210(4470):604-10.
57. Callinan PA, Feinberg AP. The emerging science of epigenomics. Hum Mol Genet. 2006;15(1):R95-101.
58. Knapowski J, Wieczorowska-Tobis K, Witowski J. Pathophysiology of ageing. J Physiol Pharmacol. 2002;53(2):135-46.
59. Milagro FI, Campion J, Cordero P, Goyenechea E, Gomez-Uriz AM, Abete I et al. A dual epigenomic approach for the search of obesity biomarkers: DNA methylation in relation to diet-induced weight loss. Faseb J. 2011;25(4):1378-89.
60. Richmond TJ, Davey CA. The structure of DNA in the nucleosome core. Nature. 2003;423(6936):145-50.
61. Clayton AL, Hazzalin CA, Mahadevan LC. Enhanced histone acetylation and transcription: a dynamic perspective. Mol Cell. 2006;23(3):289-96.
62. Li YY, Liu L, Tollefsbol TO. Glucose restriction can extend normal cell lifespan and impair precancerous cell growth through epigenetic control of hTERT and p16 expression. Faseb Journal. 2010;24(5):1442-53.
63. Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, Ellisen LW, Steiner P, Caddle SD et al. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. Cell. 1997;90(4):785-95.
64. Wang Y. Molecular links between caloric restriction and Sir2/SIRT1 activation. Diabetes Metab J. 2014;38(5):321-9.
65. Smith DL Jr, McClure JM, Matecic M, Smith JS. Calorie restriction extends the chronological lifespan of Saccharomyces cerevisiae independently of the Sirtuins. Aging Cell. 2007;6(5):649-62.
66. Anderson RM, Bitterman KJ, Wood JG, Medvedik O, Sinclair DA. Nicotinamide and PNC1 govern lifespan extension by calorie restriction in Saccharomyces cerevisiae. Nature. 2003;423(6936): 181-5.
67. Lin SJ, Kaeberlein M, Andalis AA, Sturtz LA, Defossez PA, Culotta VC et al. Calorie restriction extends Saccharomyces cerevisiae lifespan by increasing respiration. Nature. 2002;418(6895):344-8.
68. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. Nature. 2000;403(6765):41-5.
69. Fischle W, Wang Y, Allis CD. Histone and chromatin cross-talk. Curr Opin Cell Biol. 2003;15(2):172-83.
70. Ji LL, Peterson DM. Aging, exercise, and phytochemicals: promises and pitfalls. Ann N Y Acad Sci. 2004;1019:453-61.
71. Horst MA. Compostos biotiavos de alimentos. In: Cozzolino SMF, Cominetti C. Bases bioquímicas e fisiológicas da nutrição: nas diferentes fases da vida, na saúde e na doença. Barueri: Manole; 2013.
72. Si H, Liu D. Dietary antiaging phytochemicals and mechanisms associated with prolonged survival. J Nutr Biochem. 2014;25(6):581-91.
73. Catalgol B, Batirel S, Taga Y, Ozer NK. Resveratrol: French paradox revisited. Front Pharmacol. 2012;3:141.
74. Gu X, Creasy L, Kester A, Zeece M. Capillary electrophoretic determination of resveratrol in wines. J Agric Food Chem. 1999;47(8):3223-7.
75. Schrauwen P, Timmers S. Can resveratrol help to maintain metabolic health? Proc Nutr Soc. 2014;73(2):271-7
76. Smoliga JM, Baur JA, Hausenblas HA. Resveratrol and health: a comprehensive review of human clinical trials. Mol Nutr Food Res. 2011;55(8):1129-41.
77. Guo H, Chen Y, Liao L, Wu W. Resveratrol protects HUVECs from oxidized-LDL induced oxidative damage by autophagy upregulation via the AMPK/SIRT1 pathway. Cardiovasc Drugs Ther. 2013;27(3):189-98.
78. Fremont L, Belguendouz L, Delpal S. Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. Life Sci. 1999;64(26):2511-21.
79. Frankel EN, Waterhouse AL, Kinsella JE. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. Lancet. 1993;341(8852):1103-04.
80. Szkudelski T, Szkudelska K. Resveratrol and diabetes: from animal to human studies. Biochim Biophys Acta. 2015;1852(6):1145-54.
81. Timmers S, Hesselink MK, Schrauwen P. Therapeutic potential of resveratrol in obesity and type 2 diabetes: new avenues for health benefits? Ann NY Acad Sci. 2013;1290:83-9.
82. Singh CK, Ndiaye MA, Ahmad N. Resveratrol and cancer: Challenges for clinical translation. Biochim Biophys Acta. 2014;1852(6).
83. Granzotto A, Zatta P. Resveratrol and Alzheimer's disease: message in a bottle on red wine and cognition. Front Aging Neurosci. 2014;6:95.

84. Wang IH, Chen HY, Wang YH, Chang KW, Chen YC, Chang CR. Resveratrol modulates mitochondria dynamics in replicative senescent yeast cells. PLoS One. 2014;9(8):e104345.
85. Wang C, Wheeler CT, Alberico T, Sun X, Seeberger J, Laslo M et al. The effect of resveratrol on lifespan depends on both gender and dietary nutrient composition in Drosophila melanogaster. Age (Dordr). 2013;35(1):69-81.
86. Chen W, Rezaizadehnajafi L, Wink M. Influence of resveratrol on oxidative stress resistance and life span in Caenorhabditis elegans. J Pharm Pharmacol. 2013;65(5):682-8.
87. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. Nature. 2006;444(7117):337-42.
88. Pearson KJ, Baur JA, Lewis KN, Peshkin L, Price NL, Labinskyy N et al. Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. Cell Metabolism. 2008;8(2):157-68.
89. Brasnyo P, Molnar GA, Mohas M, Marko L, Laczy B, Cseh J et al. Resveratrol improves insulin sensitivity, reduces oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients. British J Nutrition. 2011;106(3):383-9.
90. Wong RHX, Howe PRC, Buckley JD, Coates AM, Kunz I, Berry NM. Acute resveratrol supplementation improves flow-mediated dilatation in overweight/obese individuals with mildly elevated blood pressure. Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases. 2011;21(11):851-6.
91. Ghanim H, Sia CL, Abuaysheh S, Korzeniewski K, Patnaik P, Marumganti A et al. An anti-inflammatory and reactive oxygen species suppressive effects of an extract of polygonum cuspidatum containing resveratrol. J Clin Endocr & Metabol. 2010; 95(9):E1-8.
92. Pereira TCB, Rico EP, Rosemberg DB, Schirmer H, Dias RD, Souto AA et al. Zebrafish as a model organism to evaluate drugs potentially able to modulate sirtuin expression. Zebrafish. 2011;8(1):9-16.
93. Schirmer H, Pereira TC, Rico EP, Rosemberg DB, Bonan CD, Bogo MR. Modulatory effect of resveratrol on SIRT1, SIRT3, SIRT4, PGC1alpha and NAMPT gene expression profiles in wild-type adult zebrafish liver. Mol Biol Rep. 2012;39(3):3281-9.
94. Gertz M, Nguyen GT, Fischer F, Suenkel B, Schlicker C, Franzel B et al. A molecular mechanism for direct sirtuin activation by resveratrol. PLoS One. 2012;7(11):e49761.
95. Xie S, Sinha RA, Singh BK, Li GD, Han W, Yen PM. Resveratrol induces insulin gene expression in mouse pancreatic alpha-cells. Cell Biosci. 2013;3(1):47.
96. Wang Y, Sun Z. Current understanding of klotho. Ageing Res Rev. 2009;8(1):43-51.
97. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. Nature. 1997;390(6655):45-51.
98. Utsugi T, Ohno T, Ohyama Y, Uchiyama T, Saito Y, Matsumura Y. Decreased insulin production and increased insulin sensitivity in the klotho mutant mouse, a novel animal model for human aging. Metabolism. 2000;49(9):1118-23.
99. Hsu SC, Huang SM, Chen A, Sun CY, Lin SH, Chen JS et al. Resveratrol increases anti-aging Klotho gene expression via the activating transcription factor 3/c-Jun complex-mediated signaling pathway. Int J Biochem Cell Biol. 2014;53:361-71.
100. Ahn J, Cho I, Kim S, Kwon D, Ha T. Dietary resveratrol alters lipid metabolism-related gene expression of mice on an atherogenic diet. J Hepatol. 2008;49(6):1019-28.
101. Tsai SH, Lin-Shiau SY, Lin JK. Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NFkappaB in macrophages by resveratrol. Br J Pharmacol. 1999;126(3):673-80.
102. Arts ICW, van de Putte B, Hollman PCH. Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2000;48(5):1746-51.
103. Kim H, Keeney PG. (-)-Epicatechin Content in Fermented and Unfermented Cocoa Beans. Journal of Food Science. 1984;49(4): 1090-2.
104. Desideri G, Kwik-Uribe C, Grassi D, Necozione S, Ghiadoni L, Mastroiacovo D et al. Benefits in cognitive function, blood pressure, and insulin resistance through cocoa flavanol consumption in elderly subjects with mild cognitive impairment: the Cocoa, Cognition, and Aging (CoCoA) study. Hypertension. 2012;60(3):794-801.
105. Bayard V, Chamorro F, Motta J, Hollenberg NK. Does flavanol intake influence mortality from nitric oxide-dependent processes? Ischemic heart disease, stroke, diabetes mellitus, and cancer in Panama. Int J Med Sci. 2007;4(1):53-8.
106. Fisher ND, Hollenberg NK. Aging and vascular responses to flavanol-rich cocoa. J Hypertens. 2006;24(8):1575-80.
107. Ding EL, Hutfless SM, Ding X, Girotra S. Chocolate and prevention of cardiovascular disease: a systematic review. Nutr Metab (Lond). 2006;3:2.
108. Kim MJ, Ryu GR, Kang JH, Sim SS, Min DS, Rhie DJ et al. Inhibitory effects of epicatechin on interleukin-1beta-induced inducible nitric oxide synthase expression in RINm5F cells and rat pancreatic islets by down-regulation of NF-kappaB activation. Biochem Pharmacol. 2004;68(9):1775-85.
109. Noe V, Penuelas S, Lamuela-Raventos RM, Permanyer J, Ciudad CJ, Izquierdo-Pulido M. Epicatechin and a cocoa polyphenolic extract modulate gene expression in human Caco-2 cells. J Nutr. 2004;134(10):2509-16.
110. Vazquez-Prieto MA, Bettaieb A, Haj FG, Fraga CG, Oteiza PI. (-)-Epicatechin prevents TNFalpha-induced activation of signaling cascades involved in inflammation and insulin sensitivity in 3T3-L1 adipocytes. Arch Biochem Biophys 2012;527(2):113-8.
111. Ruijters EJ, Weseler AR, Kicken C, Haenen GR, Bast A. The flavanol (-)-epicatechin and its metabolites protect against oxidative stress in primary endothelial cells via a direct antioxidant effect. Eur J Pharmacol. 2013;715(1-3):147-53.
112. Morrison M, van der Heijden R, Heeringa P, Kaijzel E, Verschuren L, Blomhoff R et al. Epicatechin attenuates atherosclerosis and exerts anti-inflammatory effects on diet-induced human-CRP and NFkappaB in vivo. Atherosclerosis. 2014;233(1):149-56.
113. Basu A, Lucas EA (2007). Mechanisms and effects of green tea on cardiovascular health. Nutr Rev. 65(8 Pt 1):361-75.
114. Davalli P, Rizzi F, Caporali A, Pellacani D, Davoli S, Bettuzzi S. Anticancer activity of green tea polyphenols in prostate gland. Oxid Med Cell Longev. 2012:984219.
115. Thielecke F, Boschmann M. The potential role of green tea catechins in the prevention of the metabolic syndrome - a review. Phytochemistry. 2009;70(1):11-24.
116. Sae-tan S, Grove KA, Lambert JD. Weight control and prevention of metabolic syndrome by green tea. Pharmacol Res. 2011;64(2):146-54.
117. Li Q, Li Y. Review on the neuroprotective effects of green tea polyphenols for the treatment of neurodegenerative diseases. Wei Sheng Yan Jiu. 2010;39(1):123-6.

118. Li YM, Chan HY, Yao XQ, Huang Y, Chen ZY. Green tea catechins and broccoli reduce fat-induced mortality in Drosophila melanogaster. J Nutr Biochem. 2008;19(6):376-83.
119. Abbas S, Wink M. Epigallocatechin gallate from green tea (Camellia sinensis) increases lifespan and stress resistance in Caenorhabditis elegans. Planta Med. 2009;75(3):216-21.
120. Kitani K, Osawa T, Yokozawa T. The effects of tetrahydrocurcumin and green tea polyphenol on the survival of male C57BL/6 mice. Biogerontology. 2007;8(5):567-73.
121. Aires DJ, Rockwell G, Wang T, Frontera J, Wick J, Wang W et al. Potentiation of dietary restriction-induced lifespan extension by polyphenols. Biochim Biophys Acta. 2012;1822(4):522-6.
122. R, Miller RA, Astle CM, Baur JA, Cabo R, Fernandez E et al. Evaluation of resveratrol, green tea extract, curcumin, oxaloacetic acid, and medium-chain triglyceride oil on life span of genetically heterogeneous mice. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2013;68(1):6-16.
123. Sadakata S, Fukao A, Hisamichi S. Mortality among female practitioners of Chanoyu (Japanese tea-ceremony). Tohoku Journal of Experimental Medicine. 1992;166(4):475-7.
124. Williamson G, Manach C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. Am J Clin Nutr. 2005;81(1 Suppl):243S-55S.
125. Pietsch K, Saul N, Menzel R, Sturzenbaum SR, Steinberg CE. Quercetin mediated lifespan extension in Caenorhabditis elegans is modulated by age-1, daf-2, sek-1 and unc-43. Biogerontology. 2009;10(5):565-78.
126. Chondrogianni N, Kapeta S, Chinou I, Vassilatou K, Papassideri I, Gonos ES. Anti-ageing and rejuvenating effects of quercetin. Exp Gerontol. 2010;45(10):763-71.
127. Boots AW, Haenen GR, Bast A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. Eur J Pharmacol. 2008;585(2-3):325-37.
128. Manjeet KR, Ghosh B. Quercetin inhibits LPS-induced nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha production in murine macrophages. Int J Immunopharmacol. 1999;21(7):435-43.
129. Nair MP, Mahajan S, Reynolds JL, Aalinkeel R, Nair H, Schwartz SA et al. The flavonoid quercetin inhibits proinflammatory cytokine (tumor necrosis factor alpha) gene expression in normal peripheral blood mononuclear cells via modulation of the NF-kappa beta system. Clin Vaccine Immunol. 2006;13(3):319-28.
130. Shahed AR, Jones E, Shoskes D. Quercetin and curcumin up-regulate antioxidant gene expression in rat kidney after ureteral obstruction or ischemia/reperfusion injury. Transplant Proc. 2001;33(6):2988.
131. Kinaci MK, Erkasap N, Kucuk A, Koken T, Tosun M. Effects of quercetin on apoptosis, NF-kappaB and NOS gene expression in renal ischemia/reperfusion injury. Exp Ther Med. 2012;3(2):249-54.
132. Gong M, Garige M, Varatharajalu R, Marmillot P, Gottipati C, Leckey LC et al. Quercetin up-regulates paraoxonase 1 gene expression with concomitant protection against LDL oxidation. Biochem Biophys Res Commun. 2009;379(4):1001-4.
133. Bae CR, Park YK, Cha YS. Quercetin-rich onion peel extract suppresses adipogenesis by down-regulating adipogenic transcription factors and gene expression in 3T3-L1 adipocytes. J Sci Food Agric. 2014;94(13):2655-60.
134. Itokawa H, Shi Q, Akiyama T, Morris-Natschke SL, Lee KH. Recent advances in the investigation of curcuminoids. Chin Med. 2008;3:11.
135. Ammon HP, Wahl MA. Pharmacology of Curcuma longa. Planta Med. 1991;57(1):1-7.
136. Chandrashekara KT, Popli S, Shakarad MN. Curcumin enhances parental reproductive lifespan and progeny viability in Drosophila melanogaster. Age (Dordr). 2014;36(5):9702.
137. Soh JW, Marowsky N, Nichols TJ, Rahman AM, Miah T, Sarao P et al. Curcumin is an early-acting stage-specific inducer of extended functional longevity in Drosophila. Exp Gerontol. 2013;48(2):229-39.
138. Liao VH, Yu CW, Chu YJ, Li WH, Hsieh YC, Wang TT. Curcumin-mediated lifespan extension in Caenorhabditis elegans. Mech Ageing Dev. 2011;132(10):480-7.
139. Banji D, Banji OJ, Dasaroju S, Annamalai AR. Piperine and curcumin exhibit synergism in attenuating D-galactose induced senescence in rats. Eur J Pharmacol. 2013;703(1-3):91-9.
140. Bengmark S. Curcumin, an atoxic antioxidant and natural NFkappaB, cyclooxygenase-2, lipooxygenase, and inducible nitric oxide synthase inhibitor: a shield against acute and chronic diseases. JPEN J Parenter Enteral Nutr. 2006;30(1):45-51.
141. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappa B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. N Engl J Med. 1997;336(15):1066-71.
142. Shishodia S. Molecular mechanisms of curcumin action: gene expression. Biofactors. 2013;39(1):37-55.

Parte 5
Avanços e perspectivas

Modelos para estudos de genômica nutricional

34

Renato Heidor
Paulo Eduardo Latorre Martins Tavares
Laura Helena Gasparini Fernandes
Fernando Salvador Moreno

INTRODUÇÃO

As pesquisas em nutrição tiveram início há mais de 200 anos, em uma época caracterizada por grandes avanços no conhecimento das ciências químicas e biológicas. Entre os anos de 1910 e 1940, as ciências nutricionais procuravam compreender a relação de deficiências nutricionais com a incidência de diversas afecções. Nessa época, por exemplo, foi estabelecida a relação entre a deficiência de tiamina com o beribéri. Descobertas como essas levaram ao estabelecimento dos valores de recomendação dietética diária (RDA, *recommended dietary allowance*) para alguns nutrientes. Após serem identificados praticamente todos os nutrientes essenciais, as ciências nutricionais procuraram estabelecer a relação entre alimentação e doenças crônicas não transmissíveis (DCNT). Nesse caso, os padrões de alimentação poderiam estar relacionados não com a deficiência, mas com o excesso de nutrientes.

Nos anos seguintes, ocorreram avanços em técnicas de biologia molecular, como a utilização de endonucleases de restrição para a clivagem do DNA,[1] o desenvolvimento de metodologias de sequenciamento do DNA[2] e a origem da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR, *polymerase chain reaction*), que permite a amplificação de ácidos nucleicos.[3] Esses avanços contribuíram para que o genoma humano fosse completamente sequenciado. Como resultado, outras abordagens metodológicas avançadas surgiram, como a transcriptômica, a proteômica e a metabolômica, as quais atualmente são utilizadas para pesquisas em nutrição, em uma ciência denominada genômica nutricional.

Dessa forma, a nutrigenômica, a nutrigenética e a epigenômica nutricional (subdisciplinas da genômica nutricional) buscam elucidar o papel de nutrientes e/ou compostos bioativos de alimentos (CBA) na expressão gênica e a maneira como variações genéticas influenciam as respostas individuais à alimentação e ao risco de desenvolvimento de doenças. Para tanto, os modelos para o estudo da genômica nutricional podem ser conduzidos *in vitro* ou *in vivo,* com ferramentas clássicas de biologia molecular ou, ainda, com metodologias consideradas de alto desempenho, capazes de analisar o padrão de expressão de milhares de genes simultaneamente.

Antes do sequenciamento do genoma humano, durante as décadas de 1980 e 1990, modificações metabólicas ocasionadas por diversos padrões de alimentação ou dietas foram exploradas em diferentes níveis de regulação, pré e pós-transcricional, pré e pós-traducional. Para tanto, foram utilizadas metodologias que atualmente são consideradas clássicas, por exemplo, os diferentes métodos de *blotting* (como *Southern*, *Northern* e *Western blotting*) e a PCR, as quais serão abordadas a seguir.

FERRAMENTAS PARA O ESTUDO DA GENÔMICA NUTRICIONAL

Southern blotting

A técnica de *Southern blotting* foi desenvolvida em 1976 e é utilizada para a identificação de sequências específicas de DNA. Basicamente, após a extração, o ácido nucleico é digerido com uma ou mais endonucleases de restrição. Essas enzimas são produzidas por microrganismos e digerem o DNA em locais específicos, resultando em milhares de fragmentos. Estes são, então, separados com base em seu tamanho, por eletroforese. Nesse processo, o DNA digerido é aplicado em um gel de agarose, o qual é submetido a uma diferença de potencial elétrico. O DNA (que tem carga negativa) migra em direção ao

polo positivo do gel, com velocidade inversamente proporcional ao seu tamanho. Após a eletroforese, os fragmentos de DNA são desnaturados, geralmente em solução alcalina, e transferidos para uma membrana de nitrocelulose ou de náilon por capilaridade ou por um sistema a vácuo. Para a identificação do fragmento de interesse, utiliza-se uma sonda desnaturada e marcada com material radioativo ou fluorescente. A sonda consiste em um segmento de DNA de interesse, que pode ser obtida por clonagem em um vetor, como um plasmídeo. A sonda marcada e a membrana são incubadas em condições que favoreçam a ligação da sonda com as sequências complementares do DNA de interesse. Em seguida, a membrana é exposta a um filme de raios X, revelando o local onde ocorreu a hibridização e permitindo a identificação da sequência específica de DNA (Figura 34.1).[4]

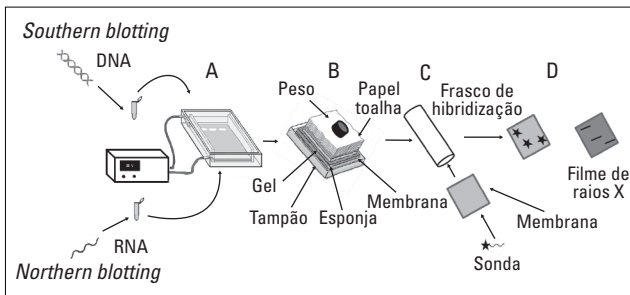



Figura 34.1 Princípios das técnicas de *Southern e Northern blotting*. Tanto o DNA (técnica de *Southern blotting*) como o RNA (técnica de *Northen blotting*) são separados em gel de agarose (A). No caso da técnica de *Southern blotting*, o DNA é clivado por endonucleases de restrição antes da separação por eletroforese. Após a separação, os ácidos nucleicos são transferidos para uma membrana, que pode ser de náilon ou de nitrocelulose. Esse processo por ocorrer por capilaridade (B) em um arranjo constituído por um tampão específico, esponja, gel de agarose, membrana, papéis toalha e um peso que pode ser um pedaço de mármore ou placa de vidro para que o arranjo fique estável. Os ácidos nucleicos são então imobilizados na membrana, que é hibridizada com uma sonda marcada. O processo de hibridização, ou seja, a ligação da sonda com o ácido nucleico, geralmente ocorre em frascos de hibridização (C) que permanecem em rotação, na posição horizontal, em fornos que mantêm a temperatura em torno de 42ºC. Após a hibridização, a membrana é exposta a um filme de raios X, permitindo a visualização da região onde ocorreu a hidridização (D).

Além de ser utilizada para a identificação de sequências específicas de DNA, inclusive dentro de uma sequência maior, como no caso do mapeamento gênico, a técnica de *Southern blotting* pode ser útil na análise de polimorfismos. Nesse caso, quando uma determinada região do DNA é digerida com enzimas de restrição, há a formação de fragmentos de comprimentos diferentes, uma vez que os padrões de clivagem podem estar alterados em razão de uma mutação. Esses padrões podem ser identificados com uma sonda por meio de uma metodologia denominada avaliação de polimorfismos pelo comprimento do fragmento de restrição (RFLP, *restriction fragment length polymorphism*). Os fragmentos obtidos em uma região de DNA com sequência repetitiva podem ser utilizados para a determinação de um *DNA fingerprint* (impressão digital de DNA), amplamente utilizado em medicina forense, em especial em testes de paternidade.[5]

Northern blotting

A técnica de *Northern blotting* é utilizada para estudo da expressão gênica pela detecção de RNA ou RNA mensageiro (RNAm). Pode ser utilizada, ainda, para avaliar a expressão de microRNA (miRNA). Metodologicamente, é muito semelhante à técnica de *Southern blotting*, exceto pela sonda, que pode ser de DNA complementar (DNAc), de oligonucleotídeos ou de uma sequência *anti-sense* de RNA marcado com isótopo radioativo ou material fluorescente (ver Figura 34.1).[6] Possíveis limitações da técnica de *Northern blotting* envolvem o risco de degradação do RNAm, que pode ocorrer principalmente durante a separação deste por eletroforese,[7] ou, ainda, a sensibilidade reduzida quando comparada com outros métodos de análise do RNA.[8] Apesar dessas limitações, ainda é um método utilizado atualmente para detecção de transcritos específicos em uma mistura complexa de RNA.[9]

Hibridização *in situ*

A hibridização *in situ* é um procedimento que possibilita a localização de sequências específicas de DNA em cromossomos ou, ainda, de RNAm em células ou tecidos fixados em uma lâmina de microscopia. Para tanto, de forma semelhante às técnicas de *Southern* e *Northern blotting,* é necessária uma sonda que se ligará a uma sequência específica de ácido nucleico.[10] A hibridização *in situ* foi utilizada, por exemplo, para avaliação dos tipos de células que seriam responsáveis pela síntese da enzima lipase pancreática.[11] Atualmente, é comum a utilização de sondas marcadas por fluorescência. Nesse caso, a técnica é denominada FISH (*fluorescence in situ hydridization*).[12]

Western blotting

A técnica de *Western blotting* é utilizada para a identificação de proteínas por meio do uso de anticorpos específicos. Basicamente, após extração, as proteínas são separadas de acordo com seu peso molecular por eletroforese em gel de poliacrilamida e, em seguida, são transferidas para uma membrana de náilon ou de fluoreto de polivinilidieno (PVDF). A transferência ocorre por diferença de potencial, sendo conhecida também por *electroblotting*. Após a transferência, a membrana é bloqueada,

ou seja, tratada com uma solução de albumina ou leite desnatado. Essa etapa é necessária para que não ocorram ligações inespecíficas do anticorpo primário. Após o bloqueio, a membrana é incubada com o anticorpo primário para a proteína de interesse e, em seguida, ocorre uma nova incubação com um anticorpo secundário. Esse anticorpo irá se ligar especificamente ao anticorpo primário e, geralmente, está ligado à biotina ou com enzimas, como fosfatase alcalina ou peroxidase de rabanete (HRP). Para a detecção, a membrana é exposta a um filme de raios X, revelando a proteína de interesse e possibilitando a sua análise densitométrica (Figura 34.2).[13] Atualmente, existem sistemas de análise de imagens que podem detectar sinais de fluorescência emitidos pelas proteínas presentes na membrana.

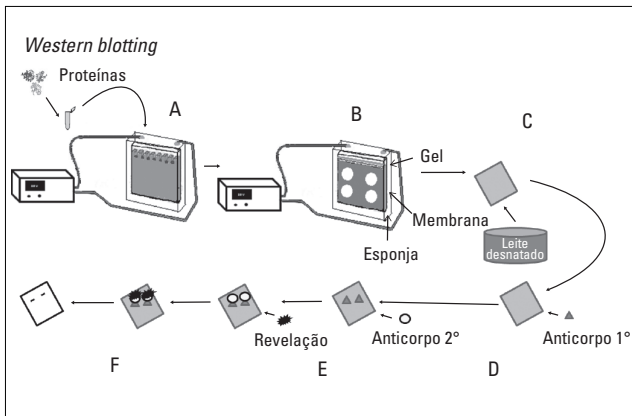



Figura 34.2 Princípios da técnica de *Western blotting.* Proteínas extraídas são separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (A). Após a eletroforese, as proteínas são transferidas para uma membrana, geralmente de PVDF, por um sistema constituído por placas eletrificadas, esponjas, gel e a membrana (B). A membrana é então submetida a uma solução com leite em pó desnatado (C) em um processo denominado bloqueio, que tem a função de minimizar as ligações inespecíficas das proteínas com o anticorpo. Após o bloqueio, a membrana é incubada com o anticorpo primário (D) e, em seguida, com o secundário (E). Geralmente, o anticorpo secundário é ligado a um reagente que emite luz quando em contato com uma solução reveladora (F), mostrando as proteínas ligadas com o anticorpo primário.

Reação em cadeia da polimerase

A técnica de PCR possibilita a amplificação de uma sequência específica de DNA. Envolve dois oligonucleotídeos, denominados iniciadores ou *primers*, que se ligarão ao fragmento a ser amplificado. Além dos *primers*, é necessária uma enzima DNA polimerase termoestável, assim como os desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP): desoxiadenosinatrifosfato (dATP), desoxicitosinatrifosfato (dCTP), desoxiguanina trifosfato (dGTP) e desoxitiminatrifosfato (dTTP) e o cofator Mg^{2+}. A mistura dos reagentes supracitados é submetida a ciclos repetidos de aquecimento e resfriamento, que correspondem à desnaturação do DNA (aproximadamente 94ºC), ao anelamento ou emparelhamento dos *primers* com a sequência a ser amplificada (entre 45 e 72ºC) e à síntese do DNA (72ºC) (Figura 34.3). O equipamento que realiza esses ciclos é denominado termociclador. Repetindo-se essas etapas diversas vezes (20 a 40 ciclos) é possível obter um produto final com uma concentração de DNA em torno de 10^5 a 10^8 vezes maior que a inicial. No caso da PCR convencional, o produto da reação é visualizado em gel de agarose corado com um composto com a capacidade de se intercalar ao DNA quando submetido à luz ultravioleta (brometo de etídio – altamente mutagênico; atualmente existem corantes supostamente mais seguros, como Safer®, GelRed® ou BlueGreen®) ou em gel de poliacrilamida corado com prata.[6]

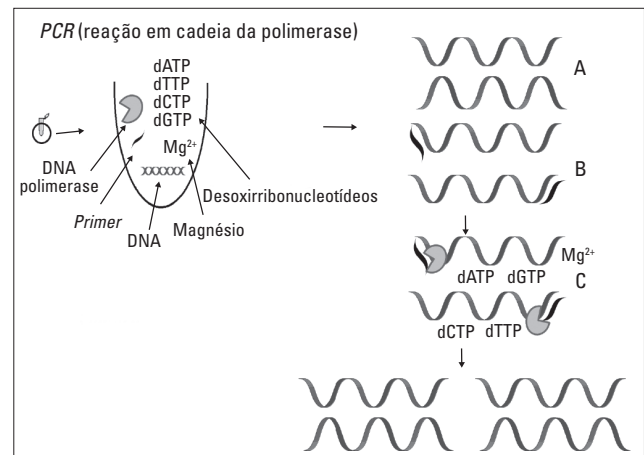



Figura 34.3 Princípio da reação em cadeia da polimerase (PCR). Em um microtubo, uma mistura contendo a sequência do DNA que se deseja amplificar, o *primer*, a solução de Mg^{2+}, os dATP, dTTP, dCTP, dGTP e a enzima DNA polimerase termoestável são submetidos a ciclos repetidos de aquecimento e resfriamento, que correspondem à desnaturação do DNA (A), anelamento ou emparelhamento dos *primers* (B) e síntese do DNA (C).

Com a utilização de *primers* que flanqueiam regiões do DNA é possível amplificar, pela reação da PCR, uma região específica desse ácido nucleico em que há suspeita de polimorfismos. Após a amplificação, o DNA deve ser submetido a outras metodologias de identificação, como o sequenciamento ou RFLP (PCR-RFLP). Quando, porém, se tem conhecimento prévio do polimorfismo em determinada região de um gene, a PCR pode ser utilizada diretamente para verificar se o polimorfismo ocorre ou não em determinada amostra de DNA, por diferentes variações da metodologia.

Para avaliação da expressão gênica, utiliza-se também a técnica de RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*), que é a transcrição reversa. Esse processo consiste, essencialmente, na conversão do RNAm em DNAc por

uma reação catalisada por uma enzima polimerase de DNA dependente de RNA, denominada transcriptase reversa. Uma sonda de oligodeoxinucleotídeos é hibridizada ao RNAm, permitindo que a transcriptase reversa inicie a extensão da sonda e sintetize uma fita de DNA complementar. A sonda pode ser planejada para que esta se hibridize a uma sequência específica do RNAm correspondente a um gene específico. Nesse caso, a sonda é constituída por um polímero de timina, denominado oligo(dT), que pode ser hibridizado com as sequências de adenina da porção 3' do RNAm, que flanqueiam a região promotora. Outra estratégia é o uso de sondas universais de hexâmetros randômicos de oligonucleotídeos que podem hibridizar em qualquer região do RNA.

O DNAc obtido é submetido à PCR. O produto da reação é tratado com fluoróforo e separado em gel de agarose. No caso do uso de sondas universais de hexâmetros randômicos de oligonucleotídeos, é necessário que seja adicionada outra sonda que irá hibridizar na sequência específica do gene de interesse presente no DNAc, que será amplificado pela PCR. A sequência amplificada é analisada em sistemas que captam a fluorescência emitida pelo gel, que está relacionada com a concentração do transcrito amplificado.[6]

O fato de existirem etapas que antecedem a reação de PCR, como a adição de sondas ao DNAc e a separação dos produtos da reação por eletroforese, tornava a técnica de RT-PCR suscetível a contaminações. Ainda nesse sentido, essas etapas impediam a automatização da técnica. A separação dos produtos por eletroforese e a análise da fluorescência poderiam ser eliminadas se a amplificação e a detecção do DNAc ocorressem simultaneamente. O risco de contaminação também seria reduzido se esse processo ocorresse em sistema fechado.[14] Assim, no final da década de 1980, desenvolveu-se um processo em que foram utilizadas sondas fluorescentes para detectar o produto da reação de PCR. Porém, esse método apresentava como limitação a necessidade de eliminar as sondas não incorporadas.[15] Pesquisadores da Roche Molecular Systems e da Chiron Corporation, empresas de biotecnologia, desenvolveram um processo que amplificava e detectava simultaneamente o DNAc. Utilizou-se brometo de etídio para que fosse incorporado ao DNAc. Assim, à medida que aumentava a concentração do transcrito amplificado, a emissão de fluorescência também aumentava. Essa emissão de fluorescência poderia ser, então, mensurada antes e após a PCR diretamente no tubo onde ocorreu a reação. Com o desenvolvimento da instrumentação analítica, atualmente existem equipamentos que medem a fluorescência durante a reação, ou em tempo real, sendo denominados, assim, termocicladores de tempo real.

A técnica de PCR em tempo real (qPCR, *quantitative PCR*) utiliza atualmente corantes fluorescentes, os quais podem ser não específicos, como os corantes que se ligam ao DNA, como SYBR Green I ou SYBR Gold, ou, ainda, específicos, como sondas marcadas com fluoróforos, como Taq Man®. Corantes não específicos apresentam custo relativamente menor e são considerados ideais para a padronização e otimização das reações de qPCR. Como apenas aumentam o sinal de fluorescência quando ligados ao DNA, o uso de corantes não específicos não permite a identificação de diferentes produtos da reação. Assim, o seu uso somente é recomendado quando apenas a sequência de interesse é amplificada. Corantes específicos, como os incorporados às sondas, também são utilizados na qPCR. Um dos mais utilizados é o sistema que envolve a hidrólise da sonda, com base na atividade da *Taq* polimerase. Assim, sondas Taq Man® consistem em uma sequência específica de oligonucleotídeos e dois compostos, cada um deles em uma extremidade da molécula. Um desses compostos é um fluoróforo (*reporter*) e o outro, um inibidor (*quencher*). Quando a sonda não está hibridizada ao DNAc, o *reporter* emite fluorescência que é absorvida pelo *quencher* e o termociclador de tempo real não detecta nenhum sinal. Quando ocorre a hibridização da sonda com o DNAc, esta é clivada em razão da atividade de exonuclease da polimerase, liberando o *reporter* e o *quencher*. Desta forma, o *quencher* não absorve a fluorescência emitida pelo *reporter*, sendo então detectada pelo equipamento. Uma das vantagens do uso do sistema com sondas marcadas com fluoróforos é a possibilidade de combinação de diversas sondas (sistemas multiplex), que pode fornecer informações a respeito da expressão de diversos genes em uma mesma reação.[16,17]

Sequenciamento do DNA

Métodos para o sequenciamento do DNA, como o de degradação química e o enzimático, foram desenvolvidos no final da década de 1970. A primeira metodologia utiliza compostos que clivam a dupla fita do DNA em posições específicas. Assim, o DNA é marcado com ^{32}P em sua extremidade 5' e, em seguida, é clivado com dimetilsulfato, hidrazina ou outros compostos ácidos ou básicos em uma ou duas bases específicas, resultando em fragmentos com guanina (G), adenina mais guanina (A+G), citosina mais timina (C+T) ou citosina (C) na extremidade 3', ou seja, a que não está marcada com o radioisótopo. O produto de cada reação de clivagem do DNA é submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida, que separa os fragmentos marcados com ^{32}P. O gel é exposto a um filme radiográfico, revelando a sequência das bases nitrogenadas (Figura 34.4).[6]

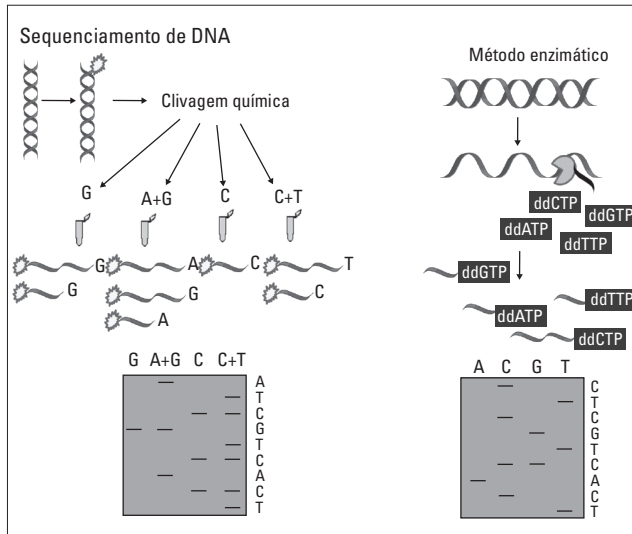



Figura 34.4 Princípio do sequenciamento do DNA. O DNA pode ser marcado com um composto radioativo e submetido a reações de clivagem química, resultando em fragmentos com extremidade contendo guanina (G), adenina mais guanina (A+G), citosina mais timina (C+T) ou citosina (C). O produto da clivagem do DNA é separado por eletroforese. Em seguida, o gel é exposto a um filme de raios X, revelando a sequência de bases nitrogenadas. No método enzimático, o DNA é hibridizado com um *primer* e é sintetizada uma nova fita de DNA, porém com uma extremidade marcada com um didesoxirribonucleotídeo, cuja inserção na nova fita de DNA bloqueia a síntese. Os fragmentos recém-sintetizados são separados em gel e podem ser detectados por um sistema de revelação adequado.

O método de clivagem química do DNA foi muito utilizado no final da década de 1970, até o estabelecimento da metodologia enzimática. Nela, o DNA é hibridizado com uma sonda, ou seja, é necessário que se conheça pelo menos a região promotora do fragmento a ser sequenciado. Na presença da DNA polimerase e de uma mistura de quatro dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), além de um didesoxirribonucleotídeo trifosfatado (ddNTP – ddATP, ddCTP, ddGTP e ddTTP), marcados com material fluorescente (antigamente marcados com ^{32}P), a fita complementar é sintetizada. Essa metodologia de incorporação aleatória de nucleotídeos modificados é universalmente conhecida como sequenciamento de Sanger, em alusão ao pesquisador Frederick Sanger, que a descreveu pela primeira vez. A reação segue o mesmo princípio daquele da PCR, com a DNA polimerase adicionando dNTP na extremidade 3' da sonda. Quando, porém, um ddNTP é incorporado em vez de um dNTP, a reação de síntese cessa, uma vez que ddNTP não apresentam hidroxila na posição 3'. Assim, são produzidos diversos fragmentos de DNA que apresentam uma extremidade com ddNTP marcado. Estes são então separados por eletroforese em gel ou em tubo capilar e detectados por um feixe de *laser* (ou filme de raio X, no caso de marcação com ^{32}P). A emissão de luz é convertida, por um computador, em gráfico de picos.[6] Após a determinação da sequência de nucleotídeos, a sua análise necessita da comparação com outras sequências de genes depositadas em bancos públicos, como o GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank). O processo de comparação ou alinhamento permite a pesquisa de similaridades entre duas ou mais sequências, a qual geralmente é realizada com *softwares* específicos, como o Blast – Basic Local Alignment Search Tool (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) ou o BioEdit Sequence Alignment Editor (www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html).

Um importante avanço na tecnologia de sequenciamento foi o desenvolvimento do método *shotgun*, em que o DNA genômico é dividido em diversos fragmentos e depois sequenciado pela metodologia de Sanger. Apesar de apresentar várias etapas, esse método foi automatizado, permitindo sequenciamento de genomas complexos como o humano, e deu origem aos equipamentos de sequenciamento de primeira geração, amplamente utilizados até por volta de 2005.

Novos métodos para a identificação da sequência de bases do DNA foram desenvolvidos e, a partir de 2005, estavam disponíveis equipamentos que utilizavam tecnologias de sequenciamento de última geração. Essas plataformas apresentam como características: menor custo por base sequenciada, redução do tempo para sequenciamento e eficiência superior quando comparadas aos equipamentos com base no método de Sanger.

O primeiro sistema de sequenciamento de última geração a ser utilizado em larga escala baseou-se no pirossequenciamento. Ao contrário do método de Sanger, que tem como base a produção de ddNTP marcados, esse sistema, denominado 454 FLX (Roche Diagnostics Corporation), tem como princípio o sequenciamento por síntese. Assim, o DNA a ser analisado é fragmentado e ligado a moléculas adaptadoras A e B nas posições 3' e 5', respectivamente. Esses adaptadores consistem em sequências de desoxinucleotídeos. Os fragmentos de DNA são, então, ligados a microesferas, que apresentam uma sequência complementar às dos desoxinucleotídeos dos adaptadores B. As microesferas permanecem em uma emulsão de água e óleo com os reagentes necessários para uma PCR, sendo o adaptador A utilizado para o anelamento com a sonda. A emulsão permite a formação de micelas que capturam as microesferas que, no final da reação de PCR, são depositadas em microplacas de sílica. Essas microplacas apresentam milhares de poços, com diâmetro suficiente para abrigar somente uma microesfera. Nessas microplacas ocorre o sequenciamento por ciclos. Assim, em cada ciclo, determinado tipo de nucleotídeo é adicionado. Se o nucleotídeo for incorporado à sequência amplificada, um pirofosfato é liberado. O

pirofosfato é convertido a ATP por ação da ATP sulforilase na presença de fosfosulfato de 5' adenosina. A síntese de ATP favorece a conversão da luciferina em oxiluciferina, que emite luz proporcionalmente à quantidade de ATP envolvida nas reações anteriores. A luz é capturada por uma câmera CCD (*charge-coupled devise*), que gera um gráfico de picos, nesse caso denominado pirograma. Como o nucleotídeo a ser incorporado é conhecido, a sequência da amostra de DNA pode ser obtida com a análise do pirograma.[18]

Outro método de sequenciamento de última geração utiliza como princípio a PCR em fase sólida. Essa plataforma, denominada Solexa (Illumina Incorporation), realiza o sequenciamento do DNA de forma semelhante ao método de Sanger, com o uso de fluoróforos. Assim como ocorre com o pirossequenciamento, o DNA é fragmentado e ligado a adaptadores. O DNA é então imobilizado por hibridização de um dos adaptadores em um suporte sólido onde estão também aderidos oligonuneotídeos. O DNA imobilizado é submetido à PCR e o produto final é formado por *clusters*, ou seja, conjuntos de sequências idênticas ligadas no suporte. Com a incorporação de nucleotídeos terminadores marcados e excitação a *laser*, é gerado um sinal, que é captado por um dispositivo de leitura e interpretado como um dos quatro possíveis nucleotídeos.[18]

Plataformas de sequenciamento de nova geração ainda apresentam custo de aquisição elevado. Entretanto, estão presentes em alguns laboratórios no Brasil e no exterior. Apesar da eficiência em custo e em tempo por base sequenciada por essas plataformas de nova geração, o método de Sanger ainda é considerado eficiente e é utilizado para o sequenciamento de trechos de DNA.

FERRAMENTAS ÔMICAS

A evolução da área de genômica nutricional foi favorecida pelo desenvolvimento de ferramentas ômicas, ocorrido em meados da década de 1990 e início dos anos 2000. Dentre elas se destacam a transcriptômica, a proteômica e a metabolômica, que avaliam os transcritos, as proteínas e os metabólitos, respectivamente. Assim, de forma diferente do genoma, que é modificado lentamente ao longo de gerações, o transcriptoma, o proteoma e o metaboloma estão sujeitos a alterações constantes, em resposta a fatores ambientais, como a alimentação.[19]

Transcriptômica

Atualmente, a tecnologia de microarranjos de DNA é a principal ferramenta para a análise transcriptômica, possibilitando avaliar simultaneamente milhares de transcritos.[20] Como o componente transcriptômico já é conhecido, em função do sequenciamento completo do genoma humano, estudos em genômica nutricional podem ter como foco a análise do RNAm.[21]

Essencialmente, a metodologia de microarranjos ou DNA-chip consiste em uma avaliação quantitativa de RNAm que estão diretamente relacionados com o nível de expressão de determinados genes (Figura 34.5). Os microarranjos consistem em sondas imobilizadas em regiões específicas de uma matriz de vidro. O princípio do método baseia-se na hibridização dos DNAc obtido a partir do RNAm da amostra de estudo com as sondas imobilizadas no microarranjos, já que estas apresentam sequências similares aos genes de interesse. Basicamente, após a conversão do RNAm em DNAc, este é submetido a PCR e marcado com dois corantes fluorescentes, como os marcados com cianinas 3 e 5 (Cy3 e Cy5) que são incorporados no DNAc como dUTP ou dCTP modificadas. Após a hibridização, a matriz de vidro é lavada para a remoção dos DNAc não hibridizados e, em seguida, exposta a um feixe de raios *laser*, que faz com que os corantes emitam fluorescência. A análise por DNA-chip é comparativa, ou seja, pode ser entre uma amostra de DNAc obtida de um tecido normal marcada com Cy3, por exemplo, que emite luz verde, e outra de um tecido neoplásico marcada com Cy5, que emite luz vermelha. A intensidade de fluorescência é captada por leitores (*scanners*) específicos que geram imagens correspondentes ao padrão de expressão gênica analisado.[22]

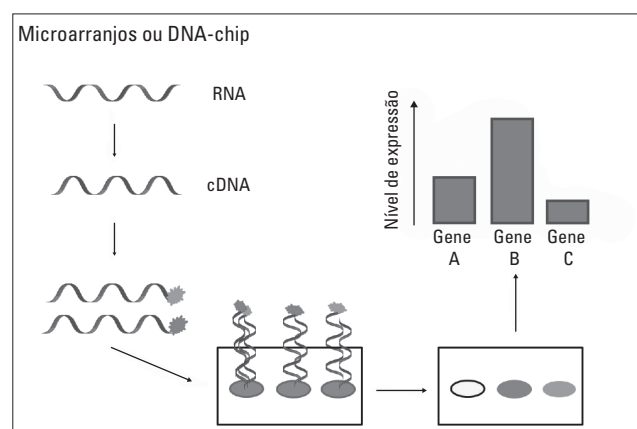



Figura 34.5 Princípio da técnica de microarranjos ou DNA-chip. O RNA extraído é convertido em DNAc, o qual é, então, marcado com fluoróforos. O DNAc marcado é aplicado em placas de microarranjos que podem conter até 20 mil genes. Quando ocorre uma ligação ou hidridização do DNAc marcado com a sequência imobilizada na placa, há a emissão de luz. Com o auxílio de leitores específicos, é possível mensurar a intensidade de luz emitida e quantificar o padrão de expressão gênica.

Proteômica

A proteômica é uma ferramenta importante para o estudo da função gênica. Representa o elo entre a sequência do genoma e o comportamento celular. A proteômica identifica, quantifica e determina a localização e as modificações de proteínas, como fosforilação ou acetilação. Estuda também as suas atividades e funções.[23] Assim, o estudo das proteínas torna-se mais complexo que o dos ácidos nucleicos, uma vez que elas podem sofrer modificações pós-tradução e participar de processos celulares distintos. Assim, um genoma pode apresentar diversos proteomas.[24]

Estudos de proteômica utilizam eletroforese uni ou bidimensional em gel e isoeletrofocalização para a obtenção das proteínas. Também é utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com colunas específicas para separação de proteínas.[21] A identificação se dá por espectrometria de massa, que é uma técnica sensível e seletiva. Para análise por espectrometria de massa, as proteínas extraídas devem estar fracionadas e digeridas em peptídeos por proteases. Esses peptídeos são então ionizados e separados de acordo com a relação massa-carga, fornecendo informações a respeito do peso molecular e estrutura da proteína. O espectrômetro de massa é constituído basicamente por três partes: uma fonte de íons, um analisador de massas e um detector. As fontes de íons empregadas para análises proteômicas são ionização por desorção a *laser* assistida por matriz (MALDI, *matrix-assisted laser desorption/ionization*) e ionização por *eletrospray* (ESI, *electrospray ionization*). Os analisadores de massas têm como função básica separar os íons formados de acordo com a massa e a carga (m/z) e incluem tempo de voo (TOF, *time of fligth*), o triplo-quadrupolo (MS/MS) e *ion trap* (sequestrador de íons), dentre outros. Esses analisadores podem ser utilizados individualmente de maneira independente ou acoplados entre si, dando origem aos equipamentos classificados como híbridos, que permitem experimentos em sequência (*tandem*), como o TOF-MS/MS ou o Ion Trap-MS/MS.[25]

Metabolômica

Abordagens metabolômicas possibilitam a análise da concentração de metabólitos em células, tecidos e fluidos biológicos, revelando não apenas o produto final da atividade enzimática, mas também a cinética em que esses compostos são produzidos, assim como a localização celular ou tecidual. Assim, a metabolômica, quando integrada à transcriptômica e à proteômica, fornece uma visão global das alterações moleculares promovidas por fatores ambientais, como a alimentação.[26] Os principais métodos para a análise metabolômica em amostras biológicas são a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR) e a cromatografia a gás ou líquida acoplada à espectrometria de massa. Um dos principais problemas para a análise metabolômica, porém, é a identificação de milhares de compostos que atualmente não podem ter suas concentrações confirmadas em razão da ausência de padrões analíticos. Entretanto, parece ser uma abordagem promissora para o estabelecimento da nutrição personalizada a partir do genótipo. Em razão da sua importância, a metabolômica será descrita de forma detalhada no Capítulo 35.

Atualmente, ferramentas para o estudo da genômica nutricional podem ser utilizadas em duas estratégias que são complementares. A primeira constitui a hipótese tradicional, em que a expressão de genes e proteínas que são moduladas por nutrientes ou CBA pode ser identificada com o uso de metodologias clássicas ou, ainda, com abordagens transcriptômicas, proteômicas e metabolômicas. Modelos *in vivo* e *in vitro* são fundamentais para essa estratégia, uma vez que possibilitam a identificação da expressão de novos genes ou da ativação de vias metabólicas distintas.[27]

A segunda abordagem é denominada biologia de sistemas e fundamenta-se no conceito de que um sistema complexo, como uma população de células, um órgão ou todo o organismo, apresenta propriedades que não podem ser originadas diretamente da soma de eventos que ocorrem em nível molecular e celular. A biologia de sistemas integra as informações obtidas em estudos de transcriptômica, proteômica e metabolômica em diferentes modelos experimentais (*in vitro* e *in vivo*) e possibilita a extrapolação de resultados, com o uso de modelos computacionais sugerindo quais vias moleculares podem ser moduladas por nutrientes ou CBA.[27,28]

MODELOS PARA ESTUDO DE GENÔMICA NUTRICIONAL *IN VITRO*

Modelos *in vitro* consistem em compartimentos de organelas intracelulares, cultura de células ou de tecidos de diversas origens, inclusive humana. As bases experimentais que possibilitaram o cultivo de células isoladas de um organismo foram estabelecidas por Sydney Ringer, em meados do século XIX, ao desenvolver soluções salinas que conservavam órgãos isolados. Nesse sentido, Wihelm Roux, em 1885, conseguiu cultivar em solução salina células embrionárias isoladas de galinhas durante vários dias. No início do século XX, diversos pesquisadores conseguiam manter vivos fragmentos de tecidos de animais em ambientes controlados. As técnicas de cultivo tecidual evoluíram a tal ponto que, em 1952, foi estabelecida a primeira linhagem celular contínua humana, a He-

La.[29] Também na década de 1950 foram incorporados diversos avanços para técnicas *in vitro*, como o uso de antibióticos e a padronização dos meios de cultura.[30]

Os microssomos, fragmentos de retículo endoplasmático liso, são exemplos de modelos *in vitro* de estudo de compartimento de células. Esse tipo de modelo é amplamente utilizado para analisar as atividades das enzimas de fase 1 (que incluem as isoformas CYP – citocromo P450) e 2 de metabolização de xenobióticos.[31]

Atualmente, a cultura de tecidos e, principalmente, de células é uma técnica amplamente utilizada em laboratórios de pesquisas. Entre suas aplicações (Figura 34.6), modelos *in vitro* representam recurso para a investigação da fisiologia celular e de processos biológicos que são modulados pela ação de nutrientes e CBA.[31] A utilização de culturas celulares ou teciduais carece de cuidados adequados para que o modelo *in vitro* se aproxime ao máximo de suas características de origem, sendo necessárias condições de cultivo adequadas. Assim, cuidados com a assepsia e condições de cultivo que envolvem pH, substrato, soro, fatores de crescimento fisiológicos, hormônios, oxigênio e gás carbônico são fatores determinantes para a obtenção de resultados reproduzíveis.[30]

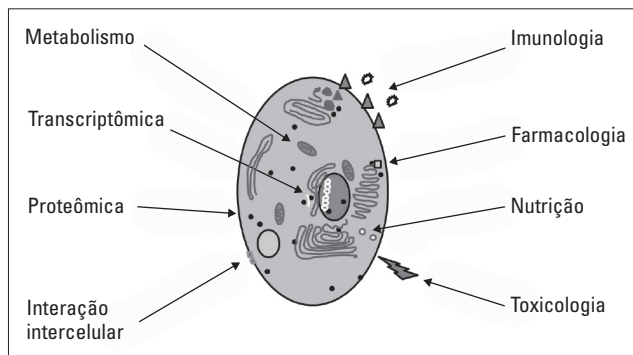



Figura 34.6 Diversas aplicações da cultura de células. Estudos que envolvem cultura de células podem apresentar diversas aplicações, principalmente quando são avaliados metabólitos e estruturas celulares que são de difícil isolamento de tecidos animais, como estudos que abrangem mecanismos envolvidos com o metabolismo energético ou com a modulação da membrana celular. Como as culturas de células podem responder rapidamente a determinado tratamento quando comparadas a um organismo, elas são amplamente utilizadas para ensaios toxicológicos, farmacológicos e nutricionais. Nesse caso, biomarcadores celulares são analisados, como modificações na expressão de genes e proteínas, ou, ainda, interações célula-célula, ou liberação de citocinas, observadas na resposta imunológica.

A cultura de células de animais ou de seres humanos pode ter início pela dispersão de células provenientes do sangue ou de biópsias em um meio nutritivo apropriado presente em um frasco ou placa (Figura 34.7). Quando as células aderem à superfície do frasco ou da placa, tem-se a cultura em monocamada; porém, quando as células sobrevivem e proliferam sem a necessidade de adesão, tem-se a cultura em suspensão. Quando as células são provenientes diretamente do tecido de origem, são denominadas cultura primária. Quando as células da cultura primária aumentam em número, a camada do substrato do cultivo celular é ocupada e as células confluem, estabelecendo contato intercelular. Torna-se, então, necessário produzir subculturas sucessivas.

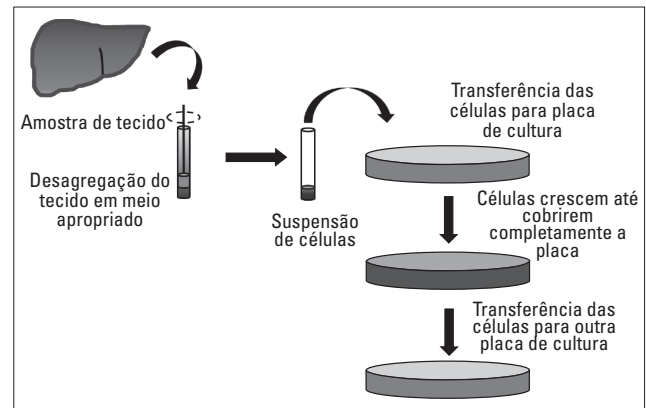



Figura 34.7 Princípios da cultura primária de células.

Para a manutenção das células em cultura, é necessária a conservação de uma atmosfera adequada, que ocorre em estufas de CO_2. Nesses equipamentos, a temperatura é mantida em 37°C, com uma mistura de gases umidificada e controlada em 5% de CO_2 e 95% de O_2. Dessa forma, é mantido também o pH do meio, em torno de 7,4, já que este pode ser modulado a partir das pressões parciais de O_2 e de CO_2 do ambiente.

O meio de cultura fornece nutrientes e substratos adequados para garantir o crescimento celular ótimo (Figura 34.8). Um dos substratos mais utilizados é o soro fetal bovino, que contém uma mistura complexa de fatores de crescimento, hormônios, proteínas e vitaminas. Outras substâncias que podem ser adicionadas ao meio de cultura são os antibióticos, utilizados para reduzir a frequência de contaminação. Mais recentemente, porém, tem-se recomendado a não utilização desses fármacos em meios de cultura, uma vez que podem estimular o desenvolvimento de organismos resistentes, mascarar infecções por micoplasma, além de interferir em diversas vias metabólicas.[31]

Para a avaliação da ação de um nutriente ou CBA *in vitro*, é necessária, em um primeiro momento, a análise do crescimento celular. Para tanto, diversas metodologias estão disponíveis, como a marcação com azul de tripan, cristal violeta, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio (MTT) e timidina marcada com trítio ([^{3}H]-timidina). Embora esta última seja utilizada por alguns pesquisadores para a avaliação da proliferação celular, uma vez que, durante a síntese de DNA, as células incorporam a timidina marcada com trítio, sua análi-

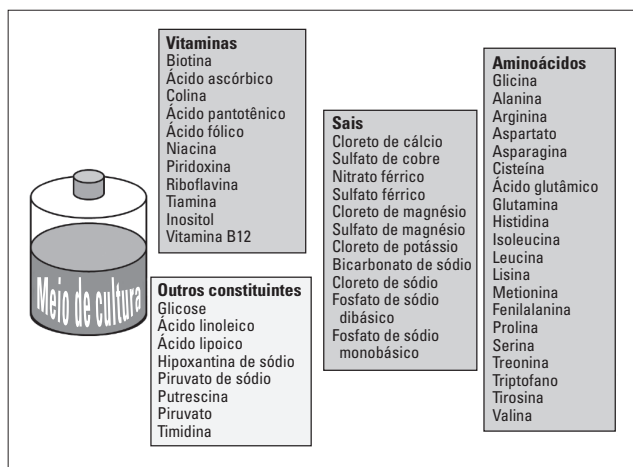



Figura 34.8 Constituintes básicos de um meio de cultura.

se requer equipamentos específicos. Além disso, há restrições no Brasil para a aquisição de radioisótopos, que pode ser realizada somente por pesquisadores capacitados e que trabalhem em instituições autorizadas pela Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN).

Outro método utilizado para a avaliação da proliferação e fisiologia celular é a citometria de fluxo. O método tem como base a captação de comprimentos de onda emitidos por células, estejam elas marcadas ou não com compostos fluorescentes, como sondas ou anticorpos (Figura 34.9). Esses compostos fluorescentes podem marcar proteínas diversas, inclusive as relacionadas com o ciclo celular e a apoptose, ou até mesmo ácidos nucleicos.[31] Assim, a citometria de fluxo permite avaliar os efeitos de nutrientes e de CBA na regulação do ciclo celular, sendo uma metodologia útil para estudos de genômica nutricional.

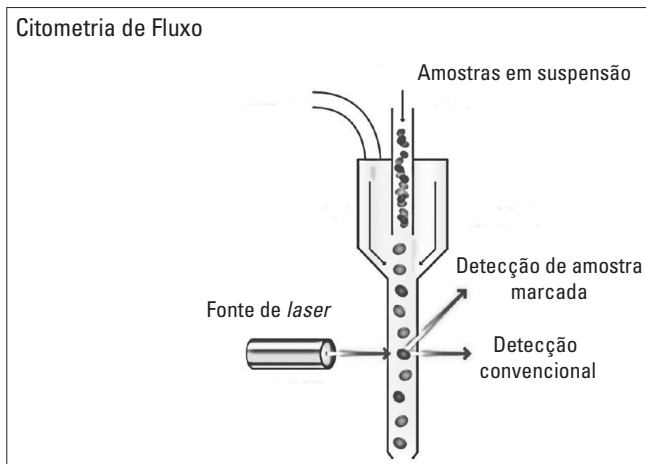



Figura 34.9 Princípio da técnica de citometria de fluxo utilizada para a captação de comprimentos de onda emitidos por células. Estas podem estar ou não marcadas com compostos fluorescentes, como sondas ou anticorpos. Com a emissão de um *laser*, é possível detectar células que apresentam ou não expressão de proteínas específicas.

Um exemplo de linhagem de célula amplamente utilizada em estudos de genômica nutricional é a Caco-2. Essa linhagem é derivada de um carcinoma colorretal que apresenta muitas das características morfológicas típicas de um enterócito humano normal.[32] Células Caco-2 podem ser úteis para avaliação da absorção intestinal de fármacos, de nutrientes e de CBA. Outro exemplo de linhagem de célula amplamente utilizada em estudos de genômica nutricional é a HepG2, derivada de um carcinoma hepatocelular humano. Ela já foi utilizada para a avaliação da modulação da expressão gênica de nutrientes como o zinco[33] ou de CBA como compostos fenólicos.[34] Entretanto, a linhagem celular HepG2 apresenta atividade enzimática das enzimas de fase 1 (CYP450) e 2 reduzida quando comparada à de culturas de hepatócitos primários. Assim, essa linhagem celular não é adequada para avaliar compostos que apresentam conhecida toxicidade *in vivo*.[31]

Como existem limitações metabólicas em alguns modelos, há interesse no desenvolvimento de outros métodos de estudo *in vitro*, como a cocultura celular. Nesse caso, duas ou mais linhagens celulares são cultivadas em conjunto, compartilhando o mesmo ambiente e tratamento. Nesse sentido, coculturas de células endoteliais e de macrófagos podem ser utilizadas como um modelo *in vitro* que mimetiza o ambiente pró-inflamatório que caracteriza a formação de placas de ateroma. Esse tipo de cultura foi utilizado para a avaliação de eventos moleculares precoces da aterosclerose e sua modulação por flavonoides extraídos de folhas de *Ginkgo biloba*.[35]

Células dependem de regulação promovida pelo ambiente para sua homeostasia, ou até mesmo da vizinhança celular, como estímulos parácrinos. Uma forma de reproduzir esse microambiente é a utilização de explantes de tecidos ou até mesmo de cortes de órgãos, que são cultivados em cultura. Estes representam um modelo *in vitro* multicelular e tridimensional que apresenta funções similares a tecidos *in vivo* em razão da presença de diversos tipos celulares na sua arquitetura, além de envolver também as interações célula-célula e célula-matriz extracelular. Outra metodologia *in vitro* utilizada é a cultura de células em três dimensões (3D). Ao contrário da cultura clássica, que ocorre em monocamada, a cultura 3D aumenta as interações das células entre elas e com o ambiente. Nesse modelo, ocorre a formação de estruturas multicelulares, que apresentam, no seu interior, heterogeneidade celular com microambiente característico e exposição diferencial a nutrientes.[31]

Embora estudos *in vitro* possam ser úteis para análise do metabolismo celular e mecanismos de ação de nutrientes e CBA, eles apresentam limitações relativas ao fornecimento de informações definitivas de como com-

postos podem interagir com o organismo. Assim, é interessante que as alterações na expressão gênica observadas em estudos *in vitro* sejam também analisadas e comprovadas em modelos *in vivo*.

MODELOS PARA ESTUDO DE GENÔMICA NUTRICIONAL *IN VIVO*

Animais de laboratório

A experimentação com animais de laboratório é amplamente utilizada em estudos de nutrição. Representa uma conexão entre estudos *in vitro* e aqueles que procuram analisar o efeito de nutrientes e CBA administrados *in vivo*. Porém, a experimentação com animais de laboratório apresenta restrições éticas e morais. Animais têm comportamentos próprios de cada espécie, instinto de sobrevivência e memória. São suscetíveis ao ambiente, podendo sentir dor e estresse. De forma similar ao que ocorre com pesquisas que envolvem seres humanos, nenhum estudo com animais de laboratório deve ser iniciado antes da aprovação por uma Comissão de Ética em Pesquisa com Animais. O uso de animais de laboratório em pesquisa deve respeitar o princípio dos 3R (*replacement, reduction and refinement*). Por *replacement*, entende-se a substituição do uso de animais por outras alternativas; *reduction* representa a redução do número de animais utilizados; e *refinement*, o aprimoramento da pesquisa, com adequação dos métodos para minimizar o sofrimento animal.[36]

A experimentação pode ser realizada com animais *inbred* ou *outbred*. Animais *inbred* são também denominados isogênicos por serem geneticamente iguais. Esses animais são obtidos a partir de cruzamentos entre irmãos da mesma geração por, pelo menos, vinte gerações consecutivas. Assim, observa-se nesses animais grau elevado de consanguinidade. São utilizados frequentemente em pesquisas que envolvem o sistema imune ou ainda em estudos de carcinogênese. Em geral, os *inbred* são menores e menos férteis quando comparados aos animais heterogênicos (*outbred*). Os animais *outbred* apresentam genótipo variado por serem obtidos por meio de cruzamentos aleatórios. Assim, são utilizados em estudos em que a variabilidade genética é desejada, como aqueles que procuram reproduzir populações, como ensaios toxicológicos e nutricionais. Os *outbred* são animais robustos, mais férteis e menos suscetíveis às variações ambientais, como temperatura e umidade, quando comparados aos *inbred*.[37]

Os estudos em genômica nutricional podem utilizar diversas abordagens, como transcriptômica, proteômica e metabolômica. Nesse sentido, animais de experimentação são utilizados para compreender melhor as interações entre genes e nutrientes, já que consistem em sistemas biológicos complexos. Apesar da possibilidade de extrapolação dos fenômenos observados em uma espécie animal para outra, os resultados podem não ser totalmente preditivos do que ocorre em seres humanos.[31] Porém, o conhecimento a respeito da bioquímica, fisiologia, toxicologia e farmacologia humana ainda depende dos estudos com animais de experimentação. Ainda nesse contexto, ressalta-se que várias descobertas na área da genômica nutricional foram realizadas com modelos *in vivo*.[38]

Os estudos de genômica nutricional *in vivo* utilizam, geralmente, animais que podem ser ou não submetidos a modelo de alterações metabólicas, como obesidade, câncer e diabete. Essas condições podem ocorrer espontaneamente, como no caso dos camundongos Apc^{Min}, que são utilizados como modelos de polipose adenomatosa humana[39] ou em coelhos *Watanabe Heritable Hyperlipidemic* (WHHL) usados para estudo de hipercolesterolemia familiar humana.[40] Alguns modelos utilizam indução química de afecções, como a administração intraperitoneal de azoximetano em roedores, para estudo da carcinogênese de cólon,[41] ou, ainda, modelos que associam a administração de compostos com algum procedimento cirúrgico, como o modelo do hepatócito resistente, em que a indução da hepatocarcinogênese ocorre com a aplicação intraperitoneal de dietilnitrosamina, seguida pela administração por via oral de acetilaminofluoreno e, por fim, hepatectomia parcial a 70% (Figura 34.10).[42]

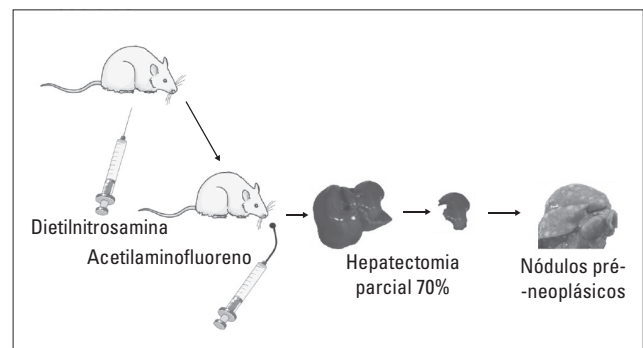



Figura 34.10 Modelo de hepatocarcinogênese do hepatócito resistente. Ratos recebem, por via intraperitoneal, dose única de dietilnitrosamina. Após duas semanas, os animais recebem, por via oral, acetilaminofluoreno. Logo em seguida, os ratos são submetidos a uma hepatectomia, em que 70% do fígado é removido. Quatro semanas após a cirurgia, é possível observar lesões pré-neoplásicas.

No caso de animais que não foram submetidos a nenhum protocolo específico para indução de alterações metabólicas, há estudos que utilizam metodologias transcriptômicas, como quando foi avaliado o efeito de diferentes fontes proteicas na expressão gênica em fígados de ratos. Com a utilização desse tipo de estudo, ratos *Spra-*

gue Dawley foram tratados com rações contendo caseína ou proteína da soja como fontes proteicas durante oito semanas. No final desse período, avaliou-se o padrão de expressão de 8 mil genes, 33% dos quais sofreram alterações no tecido hepático de ratos que ingeriram ração contendo proteína da soja. As principais modificações observadas foram o aumento da expressão de genes relacionados com o metabolismo de esteroides e com a atividade antioxidante, bem como redução da expressão de genes envolvidos com o metabolismo de aminoácidos.[43]

Um exemplo de estudo que utilizou animais que desenvolvem neoplasias espontaneamente foi o de Barone et al.,[44] no qual foi avaliado o efeito do tratamento de camundongos Apc^{Min} com rações contendo óleo de salmão ou óleo de oliva na carcinogênese de cólon. Nesse trabalho, constatou-se redução da expressão da enzima hidroximetilglutaril coenzima A redutase (HMGCoA redutase) – que apresenta papel regulatório do metabolismo do colesterol — em animais tratados com rações enriquecidas com óleo de salmão ou de oliva, quando comparados aos que receberam ração padrão. Para essa análise foi utilizada como ferramenta a qPCR.

O mecanismo de regulação da enzima HMGCoA redutase pelo betacaroteno foi avaliado em ratos submetidos a uma hepatectomia parcial a 70% como modelo de avaliação da proliferação celular. Nesse estudo, com o uso da técnica de *Northern blotting,* verificou-se que o carotenoide regula a expressão da HMGCoA redutase por mecanismos pós-transcricionais.[45] Esse trabalho, em uma perspectiva histórica, foi um dos precursores dos estudos de nutrigenômica no Brasil.

Betaionona e geraniol, CBA presentes na uva e no limão, respectivamente, também induzem modificações moleculares importantes no contexto da hepatocarcinogênese. Assim, ratos submetidos ao modelo do hepatócito resistente e tratados com betaionona tiveram aumento de expressão da HMGCoA-redutase verificado por RT-PCR. Já os animais tratados com geraniol apresentaram redução da expressão da proteína RhoA, verificada por *Western blotting*.[46]

Métodos para a substituição do uso de animais de laboratório em pesquisa evoluíram significativamente nos últimos anos. Compreendem métodos *in vitro*, como culturas de células, e *in silica*, como modelos matemáticos e simuladores.

Seres humanos

A experimentação com seres humanos apresenta diversas limitações, como restrições éticas e morais. Normas internacionais foram estabelecidas desde 1949 para que as pesquisas que envolvam seres humanos fossem desenvolvidas com princípios éticos. A Declaração de Helsinque (redigida em 1964 e com última revisão em 2013) é considerada fundamental para a proteção dos participantes de uma pesquisa. No seu primeiro artigo, ela afirma que a pesquisa envolvendo humanos deve estar adaptada aos princípios morais e científicos e basear-se em experiências de laboratório e com animais ou, ainda, em outros fatos cientificamente determinados.[47] Nesse sentido, nenhuma pesquisa envolvendo seres humanos deve ser iniciada antes da aprovação por um Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos. Com relação aos participantes do estudo, a sua seleção deve ser adequada aos objetivos do trabalho e o número de indivíduos necessários para a pesquisa deve ser calculado por um estatístico. Um termo de Consentimento Livre e Esclarecido deve ser elaborado e entregue aos participantes. Esse documento deverá detalhar todos os procedimentos experimentais a que estarão sujeitos, e indivíduos só poderão ser incluídos na pesquisa se concordarem e assinarem tal termo.

Os últimos dez anos apresentaram aumento crescente de estudos de intervenção em seres humanos com aplicação de tecnologias genômicas. Esses trabalhos têm buscado identificar novos biomarcadores que podem ser definidos como de resposta ou de suscetibilidade. Os biomarcadores de resposta refletem a modificação do metabolismo ocasionada pela ingestão de um determinado nutriente ou CBA, tanto em nível transcricional (RNA) como pós-transcricional (proteínas e metabólitos). Os biomarcadores de suscetibilidade estão associados com avaliação de polimorfismos genéticos.[28]

Metodologias transcriptômicas permitem avaliar os efeitos da ingestão de nutrientes ou CBA na expressão gênica. A literatura apresenta estudos que demonstram a modulação da expressão gênica por nutrientes ou CBA em humanos[48] e que apresentam, basicamente, um delineamento experimental comum. Embora cada trabalho tenha detectado inúmeros transcritos com diferenças de expressão, seus resultados dependeram dos valores de corte utilizados, os quais, geralmente, eram reduzidos. Assim, dados obtidos a partir de estudos de genômica nutricional com metodologias transcriptômicas em humanos demonstram alterações discretas em nível transcricional, o que pode ser esperado, uma vez que o organismo humano apresenta considerável capacidade de homeostasia. A duração reduzida dos estudos, assim como o critério de escolha dos indivíduos que participaram desses trabalhos, usualmente adultos saudáveis, também contribuiu para que os resultados obtidos fossem discretos.[48]

Em estudos de genômica nutricional em seres humanos é comum obter-se RNA a partir de amostras de sangue total, de células mononucleares do sangue periférico (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*) que

englobam monócitos e linfócitos (Th1, Th2, B e NK) ou, ainda, de biópsias. Apesar de serem utilizadas em diversos trabalhos, amostras de sangue total ou de biópsias fornecem RNA derivado de uma mistura de diferentes tipos celulares. Consequentemente, estas apresentam padrão distinto de transcrição gênica, o que pode ser considerado uma desvantagem. Isso poderia ser evitado extraindo-se o RNA de amostras de PBMC, reduzindo assim a população de células doadoras desse ácido ribonucleico.[49] Ainda nesse sentido, observou-se que existem diferenças no padrão de expressão gênica quando são comparados diferentes métodos de coleta de amostras de um mesmo tecido. Assim, amostras de biópsias de tecido adiposo obtidas por punção aspirativa por agulha fina (PAAF) apresentam mudanças na expressão de genes relacionados com o processo inflamatório quando comparadas àquelas obtidas por ressecção cirúrgica. Resultados similares foram também observados em amostras de biópsias de próstata.[50,51] A validação dos resultados obtidos por metodologias transcriptômicas por um segundo método de análise, como qRT-PCR é aconselhável. Em muitos casos, mudanças no padrão de expressão gênica podem ser confirmadas, mesmo que a análise transcriptômica apresente variações discretas nos níveis de RNAm.

Estudos que utilizam análises proteômicas em seres humanos apresentam, basicamente, o mesmo delineamento experimental de trabalhos com abordagens transcriptômicas. Há na literatura estudos que integram as duas abordagens.[48] A maior limitação desses trabalhos é a dificuldade da determinação de proteínas presentes em concentrações reduzidas, principalmente quando se analisa o plasma humano. Este apresenta como principais constituintes proteicos a albumina e as imunoglobulinas, que compreendem aproximadamente 90% do seu proteoma. Assim, em estudos que utilizam o plasma humano, é aconselhável um pré-tratamento para depleção da albumina, transferrina, fibrinogênio e de imunoglobulinas.[52,53] Outras limitações para o uso de metodologias proteômicas em estudos de genômica nutricional em humanos incluem o custo elevado, assim como o tempo excessivo necessário para o tratamento das amostras e suas análises. Em razão dessas limitações, as análises não são realizadas em amostras de todos os participantes ou são analisados *pools*, ou seja, misturas de proteínas ou outros constituintes de diversos indivíduos. Entretanto, *pools* apresentam grande variabilidade, o que pode mascarar os efeitos de uma intervenção nutricional, por exemplo. Assim como outras ferramentas ômicas, estudos com proteômica podem apresentar resultados que necessitam de confirmação por outras metodologias baseadas em anticorpos, como ELISA ou *Western blotting*.[48]

Recentemente, estudos de genômica nutricional têm incorporado abordagens metabolômicas para correlacionar metabólitos, alimentação e estado de saúde e doença. Essas tecnologias ainda estão em desenvolvimento e diversos metabólitos ainda são de difícil detecção analítica ou suas estruturas químicas ainda não foram identificadas. Assim, estudos que aplicam essas técnicas estão limitados a algumas centenas de metabólitos quantificáveis que ainda representam apenas pequena porcentagem de todas as vias metabólicas que eventualmente estejam ativadas. Dessa forma, a metabolômica fornece, atualmente, resultados limitados quando comparados com outras abordagens ômicas, como a transcriptômica.[48]

Seres humanos apresentam variações genéticas, dentre as quais as alterações em um único nucleotídeo – polimorfismos de nucleotídeo único (SNP, *single nucleotide polymorphism*) – representam aproximadamente 90% do total e podem estar relacionadas com a incidência de DCNT.[54] Nesse sentido, diversas bases de dados de SNP estão disponíveis para consulta na internet, sendo a mais abrangente a do Centro Nacional para Informação Biotecnológica (NCBI, *National Center for Biotechnology Information*) (Quadro 34.1).

Quadro 34.1 Algumas bases de dados de SNP

Base de dados e endereço na internet	Características
dbSNP (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP)	Apresenta mais de seis milhões de SNP validados do genoma completo
HapMap (http://hapmap.org/cgi-perl/gbrowse)	Apresenta um milhão de SNP presentes no genoma de quatro populações distintas
HGVbase (http://hgvbase.cgb.ki.se/)	Contém mais de 2,8 milhões de SNP do genoma completo
GVS (http://gvs.gs.washington.edu/GVS)	Integra os SNP das bases dbSNP e HapMap
Perlegen Genotype Data (http://genome.perlegen.com)	Contém 1,5 milhão de SNP presentes no genoma de três populações distintas
JSNP (http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/)	Apresenta mais de 197 mil SNP presentes na população japonesa
PharmGKB (http://www.pharmgkb.org)	Contém SNP de 167 genes envolvidos com o metabolismo de xenobióticos
SNP500Cancer (http://snp500cancer.nci.nhi.gov/home_1.cfm)	Apresenta mais de 13.400 SNP em genes envolvidos com diversos tipos de câncer
NIEHS SNPs Program (http://egp.gs.washington.edu)	Apresenta mais de 83 mil SNP em genes que podem ser modulados pelo ambiente

A análise de SNP pode consistir em uma ferramenta poderosa para o estudo de como variações individuais

promovem respostas diferentes a determinados nutrientes ou CBA e qual é o impacto destes no estado de saúde ou doença do indivíduo. Porém, deve-se considerar que DCNT são multifatoriais e, atualmente, não são conhecidos todos os polimorfismos que estão diretamente associados a essas enfermidades.[55] SNP relacionados com DCNT que podem ser modulados pela alimentação foram identificados, principalmente, com amostras de milhares de participantes de grandes estudos epidemiológicos.[54]

Modelos experimentais que procuram analisar o papel de intervenções nutricionais em indivíduos que apresentam ou não determinado polimorfismo apresentam delineamento experimental mais simples quando comparado a estudos que determinam SNP. Embora o número de participantes possa consistir em uma limitação estatística, é possível delinear estudos com número reduzido de indivíduos. A literatura apresenta diversos trabalhos com esse desenho, como um estudo que investigou o papel dos polimorfismos *PLIN1 11482G > A* e *PLIN1 13041A > G* em 78 mulheres obesas submetidas a uma dieta com restrição calórica durante 12 semanas. No final do período de restrição calórica, os autores do trabalho observaram que mulheres que carreavam o alelo A apresentaram dificuldades para redução do peso corporal. Ainda, carreadoras do alelo 11482A tiveram menor redução da circunferência da cintura e menor redução na oxidação lipídica quando comparadas às mulheres que não carreavam tal alelo.[56]

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Além dos estudos clássicos de nutrigenômica e nutrigenética, pesquisas em genômica nutricional podem apresentar abordagens que envolvem outras ciências. Assim, aspectos da biologia do desenvolvimento, como a gametogênese e a embriogênese, podem ser modulados pela alimentação e influenciar o estado de saúde e doença dos descendentes. Essas modificações ocorrem por mecanismos epigenéticos e são avaliadas principalmente em modelos com animais de experimentação.[57] Mais informações a esse respeito podem ser obtidas nos Capítulos 5 e 28.

Estudos que envolvem a relação entre nutrigenética e atividade física são, ainda, incipientes, tendo sido identificados apenas alguns SNP em seres humanos e genes que podem ser suscetíveis à regulação epigenética durante o exercício físico. Por outro lado, existe maior número de estudos a respeito da modulação da expressão gênica por nutrientes e CBA durante esse processo.[58] Pesquisas também procuram avaliar a interação entre nutrientes, microbiota e epitélio intestinal por meio de metodologias que integram microbiologia, taxonomia e genômica em um contexto denominado *gutomics*.[59] Ferramentas ômicas também estão sendo utilizadas para modificação de alimentos, principalmente frutas e hortaliças. Assim, há a possibilidade da inserção, ativação ou silenciamento de genes, o que pode resultar em produtos com melhor valor nutricional para o consumidor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Danna K, Nathans D. Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of Hemophilus influenzae. Proc Natl Acad Sci USA. 1971;68(12):2913-7.
2. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. J Mol Biol. 1975;94(3):441-8.
3. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science. 1985;230(4732):1350-4.
4. Zavala AG, Kulkarni AS, Fortunato EA. A dual color Southern blot to visualize two genomes or genic regions simultaneously. J Virol Methods. 2014;198:64-8.
5. Lee JH, Jeon JT. Methods to detect and analyze copy number variations at the genome-wide and locus-specific levels. Cytogenet Genome Res. 2008;123(1-4):333-42.
6. Chen CY. DNA polymerases drive DNA sequencing-by-synthesis technologies: both past and present. Front Microbiol. 2014;5:305.
7. Dvorák Z, Pascussi JM, Modrianský M. Approaches to messenger RNA detection - comparison of methods. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2003;147:131-5.
8. Tagliavia M, Taravella A, Marineo S, Puglia AM, La Farina M. Optimized RNA extraction and northern hybridization in streptomycetes. Biol Proced Online. 2010;17:9027.
9. Schwamb B, Pick R, Fernández SB, Völp K, Heering J, Dötsch V et al. FAM96A is a novel pro-apoptotic tumor suppressor in gastrointestinal stromal tumors. Int J Cancer. doi: 10.1002/ijc.29498. 2015.
10. Senft AP, Levine AM. Basic molecular biology. Paediatr Respir Rev. 2005;6(3):199-208.
11. Terada T, Kitamura Y, Ashida K, Matsunaga Y, Kato M, Harada K et al. Expression of pancreatic digestive enzymes in normal and pathologic epithelial cells of the human gastrointestinal system. Virchows Arch. 1997;431(3):195-203.
12. Ramasamy R, Besada S, Lamb DJ. Fluorescent in situ hybridization of human sperm: diagnostics, indications, and therapeutic implications. Fertil Steril. 2014;102(6):1534-9.
13. MacPhee DJ. Methodological considerations for improving Western blot analysis. J Pharmacol Toxicol Methods. 2010;61(2):171-7.
14. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Biotechnology. 1992;10:413-7.
15. Chehab FF, Kan YW. Detection of specific DNA sequences by fluorescence amplification: a color complementation assay. PNAS. 1989;86:9178-82.
16. Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, Solera J. Real-time PCR detection chemistry. Clin Chim Acta. 2015;439:231-50.
17. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. Nat Protoc. 2006;1:1559-82.
18. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. Nat Rev Genet. 2010;11:31-46.
19. Rist MJ, Wenzel U, Daniel H. Nutrition and food science go genomic. Trends Biotechnol. 2006;24(4):172-8.

20. Zhang X, Yap Y, Wei D, Chen G, Chen F. Novel omics technologies in nutrition research. Biotechnol Adv. 2008;26(2):169-76.
21. Kussmann M, Raymond F, Affolter M. OMICS-driven biomarker discovery in nutrition and health. J Biotechnol. 2006;124(4): 758-87.
22. Masotti A, da Sacco L, Bottazzo GF, Alisi A. Microarray technology: a promising tool in nutrigenomics. Crit Rev Food Sci Nutr. 2010;50(7):693-98.
23. Fields S. Proteomics. Proteomics in genomeland. Science. 2001;291(5507):1221-4.
24. Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. Mol Cell Biol. 1999;19(3): 1720-30.
25. Gahlaut A, Vikas Dahiy AM, Gothwal A, Kulharia M, Chhillar AK, Hooda V et al. Proteomics & metabolomics: Mapping biochemical regulations. Drug Invention Today. 2013;5:321-6.
26. Armitage EG, Rupérez CB. Metabolomics of diet-related diseases using mass spectrometry. Trends in Analytical Chemistry. 2013;52:61-73.
27. Müller M, Kersten S. Nutrigenomics: goals and strategies. Nat Rev Genet. 2003;4(4):315-22.
28. Norheim F, Gjelstad IM, Hjorth M, Vinknes KJ, Langleite TM, Holen T et al. Molecular nutrition research: the modern way of performing nutritional science. Nutrients. 2012;4(12):1898-944.
29. Scherer WF, Syverton JT, Gey GO. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. J Exp Med. 1953;97(5):695-710.
30. Freshney RI. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. 6th ed. New York: Wiley; 2010.
31. Mortensen A, Sorensen IK, Wilde C, Dragoni S, Mullerová D, Toussaint O et al. Biological models for phytochemical research: from cell to human organism. Br J Nutr. 2008;99:ES118-26.
32. Pinto R, Rabine-Leon S, Appay MD, Kedinger M, Triadou N, Dussaulx E et al. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. BioI Cell. 1983;47:323-30.
33. Quesada IM, Bustos M, Blay M, Pujadas G, Ardèvol A, Salvadó MJ et al. Dietary catechins and procyanidins modulate zinc homeostasis in human HepG2 cells. J Nutr Biochem. 2011;22(2):153-63.
34. Imam MU, Ismail M. Nutrigenomic effects of germinated brown rice and its bioactives on hepatic gluconeogenic genes in type 2 diabetic rats and HEPG2 cells. Mol Nutr Food Res. 2013;57(3):401-11.
35. Rimbach G, Saliou C, Canali R, Virgili F. Interaction between cultured endothelial cells and macrophages: in vitro model for studying flavonoids in redox-dependent gene expression. Methods Enzymol. 2001;335:387-97.
36. Balls M. Replacement of animal procedures: alternatives in research, education and testing. Lab Anim. 1994;28(3):193-211.
37. Suckow A, Weisbroth SH, Frankling CL. The laboratory rat. 2nd edition. American College of Laboratory Animal Science. 912p. 2006.
38. Mutch DM, Wahli W, Williamson G. Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of nutrition. Faseb J. 2005;19(12): 1602-16.
39. Moser AR, Pitot HC, Dove WF. A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. Science. 1990;247:322-4.
40. Goldstein JL, Kita T, Brown MS. Defective lipoprotein receptors and atherosclerosis. Lessons from an animal counterpart of familial hypercholesterolemia. N Engl J Med. 1983;309(5):288-96.
41. Bird RP. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. Cancer Lett. 1995;93(1):55-71.
42. Solt D, Farber E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. Nature. 1976;262:701-03.
43. Takamatsu K, Tachibana N, Matsumoto I, Abe K. Soy protein functionality and nutrigenomic analysis. Biofactors. 2004;21(1-4):49-53.
44. Barone M, Notarnicola M, Caruso MG, Scavo MP, Viggiani MT, Tutino V et al. Olive oil and omega-3 polyunsaturated fatty acids suppress intestinal polyp growth by modulating the apoptotic process in ApcMin/+ mice. *Carcinogenesis*. 2014;35(7):1613-9.
45. Moreno FS, Rossiello MR, Manjeshwar S, Nath R, Rao PM, Rajalakshmi S et al. Effect of beta-carotene on the expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in rat liver. Cancer Lett. 1995;96(2):201-8.
46. Cardozo MT, De Conti A, Ong TP, Scolastici C, Purgatto E, Horst MA et al. Chemopreventive effects of βionone and geraniol during rat hepatocarcinogenesis promotion: distinct actions on cell proliferation, apoptosis, HMGCoA reductase, and RhoA. J Nutr Biochem. 2011;22(2):130-5.
47. WMA Ethics Manual, 2009. World Medical Association. Medical Ethics Manual. 2nd ed. 2009. p. 140.
48. Wittwer J, Rubio-Aliaga I, Hoeft B, Bendik I, Weber P, Daniel H. Nutrigenomics in human intervention studies: current status, lessons learned and future perspectives. Mol Nutr Food Res. 2011;55(3):341-58.
49. Elliott RM. Transcriptomics and micronutrient research. Br J Nutr. 2008;99:S59-65.
50. Mutch DM, Tordjman J, Pelloux V, Hanczar B, Henegar C, Poitou C et al. Needle and surgical biopsy techniques differentially affect adipose tissue gene expression profiles. Am J Clin Nutr. 2009;89:51-7.
51. Lin DW, Coleman IM, Hawley S, Huang CY, Dumpit R, Gifford D et al. Influence of surgical manipulation on prostate gene expression: implications for molecular correlates of treatment effects and disease prognosis. J. Clin. Oncol. 2006;24:3763-70.
52. Duthie SJ, Horgan G, De Roos B, Rucklidge G, Reid M, Duncan G et al. blood folate status and expression of proteins involved in immune function, inflammation, and coagulation: biochemical and proteomic changes in the plasma of humans in response to long-term synthetic folic acid supplementation. J Proteome Res. 2010;9:1941-50.
53. Aldred S, Sozzi T, Mudway I, Grant MM, Neubert H, Kelly FJ et al. Alpha tocopherol supplementation elevates plasma apolipoprotein A1 isoforms in normal healthy subjects. Proteomics. 2006;6:1695-703.
54. Chen X, Sullivan PF. Single nucleotide polymorphism genotyping: biochemistry, protocol, cost and throughput. Pharmacogenomics J. 2003;3(2):77-96.
55. Camp KM, Trujillo E. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: nutritional genomics. J Acad Nutr Diet. 2014;114(2):299-312.
56. Ruiz JR, Larrarte E, Margareto J, Ares R, Alkorta P, Labayen I. Preliminary findings on the role of PLIN1 polymorphisms on body composition and energy metabolism response to energy restriction in obese women. Br J Nutr. 2011;106(4):486-90.
57. Ganu RS, Harris RA, Collins K, Aagaard KM. Early origins of adult disease: approaches for investigating the programmable epigenome in humans, non-human primates, and rodents. ILAR J. 2012;53(3-4):306-21.
58. Ntanasis-Stathopoulos J, Tzanninis JG, Philippou A, Koutsilieris M. Epigenetic regulation on gene expression induced by physical exercise. J Musculoskelet Neuronal Interact. 2013;13(2):133-46.
59. Dimitrov DV. The human gutome: nutrigenomics of the host-microbiome interactions. OMICS: A Journal of Integrative Biology. 2011;15(7-8):419-30.

Metabolômica aplicada aos estudos de genômica nutricional | 35

Alessandro de Carvalho Cruz
Maria Aderuza Horst

INTRODUÇÃO

Metabolômica é um campo de estudo no contexto das tecnologias ômicas, em destaque e desenvolvimento progressivos na era pós-genoma. Ela fornece a possibilidade de análise ampla e abrangente de um grande número de compostos presentes em amostras biológicas. Essa avaliação, quando aplicada em estudos de genômica nutricional, permite explorar as interações complexas entre a alimentação e o organismo humano. Consequentemente, possibilita melhor compreensão das implicações e alterações no metabolismo, mesmo que sutis, ocasionadas por padrões alimentares, alimentos, nutrientes e compostos bioativos de alimentos (CBA) em diferentes condições fisiológicas ou patológicas e, ainda, de acordo com diferentes genótipos.[1]

Os avanços tecnológicos, especialmente em espectrometria de massas (MS) e em ressonância magnética nuclear (RMN), que possibilitam a análise simultânea de um número considerável de metabólitos, proporcionaram uma visão mais globalizada sobre as alterações dinâmicas ocasionadas por interações entre o ambiente e o genoma, o transcriptoma e o proteoma, em um sistema biológico complexo. Assim, a metabolômica pode ser considerada o estudo sistemático de produtos endógenos de baixo peso molecular (metabólitos) ou do conjunto desses produtos (perfil metabólico) em amostras biológicas.[2] Pode também ser definida como uma ferramenta de análise ampla que estuda os metabólitos oriundos de um organismo vivo. Assim, a metabolômica tornou-se uma ferramenta relevante para elucidação dos processos bioquímicos envolvidos no metabolismo de nutrientes.[1]

O desenvolvimento tecnológico resultante do Projeto Genoma Humano possibilitou o progresso das ciências ômicas, evoluindo para um patamar muito superior e de maneira mais rápida, se comparada ao que ocorria anteriormente. Hoje, é possível obter melhor compreensão sobre como a informação codificada em genes é transcrita em RNA mensageiro (RNAm) e como a sua tradução resulta em proteínas, as quais, finalmente, após a execução de suas funções, podem originar metabólitos. Assim, a cascata ômica típica apresentada na Figura 35.1 é representada pela genômica, que tem como objetivo estudar o genoma; pela transcriptômica, que avalia o conjunto de transcritos oriundos da informação do genoma; pela proteômica, que analisa as proteínas traduzidas a partir da informação carreada pelos transcritos; e, finalmente, pela metabolômica, que tem como objetivo determinar os produtos do metabolismo individual, ou seja, os compostos de baixo peso molecular, chamados de metabólitos.

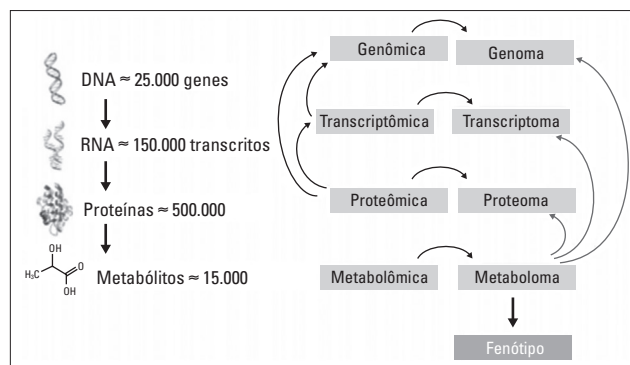



Figura 35.1 Representação da cascata "ômica" no contexto da biologia de sistemas. **Fonte:** adaptada de Bujak et al.[3]

Dessa forma, o metaboloma pode ser considerado o elo entre o genótipo e o fenótipo. Por consequência, metabólitos podem ser identificados como biomarcadores de variações genéticas, de condições fisiológicas ou patológi-

cas e de intervenções nutricionais, podendo ser utilizados no direcionamento da adoção de hábitos e de estilo de vida que resultem em homeostase fisiológica (Figura 35.2). Cabe destacar que a determinação de metabólitos como biomarcadores não é simples, uma vez que existem inúmeras interações de rede e de *feedback* entre metabólitos, proteínas, transcritos e genes, e estas estão sujeitas, ainda, à modulação ambiental, incluindo a alimentação.[3] Além disso, os metabólitos podem regular a expressão de genes, alterar a atividade de enzimas e as funções das proteínas.[4]

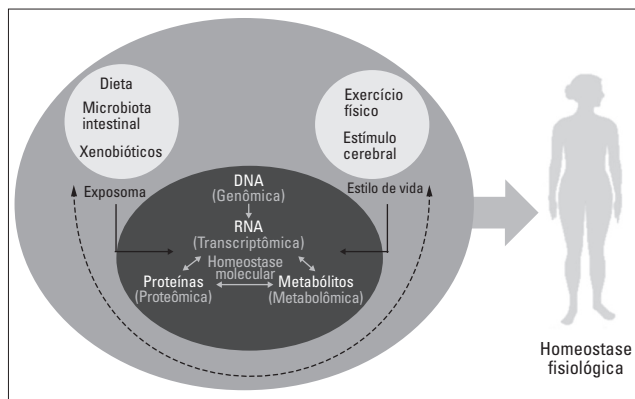



Figura 35.2 A homeostase fisiológica de um organismo é produto de interações complexas entre RNA, proteínas e metabólitos. O sistema biológico é constantemente moldado por influências ambientais que podem ser classificadas em duas categorias principais: o expossoma e o estilo de vida. O primeiro contempla todos os fatores externos, como a alimentação, a microbiota intestinal e os xenobióticos, incluindo os poluentes ambientais a que um indivíduo possa ser exposto. O segundo diz respeito à atividade física, ao estímulo cerebral e ao estresse emocional. Todos esses elementos precisam estar em equilíbrio para que a homeostase fisiológica seja mantida. Por meio da análise de metabólitos específicos, a metabolômica fornece avaliação do estado metabólico global de um organismo, oferecendo medidas cumulativas de todas as interações. **Fonte:** adaptada de Bujak et al.[3]

A relação entre genes, alimentação e saúde é complexa e ainda não está completamente elucidada. Nesse sentido, a metabolômica é uma ferramenta essencial para estudos de genômica nutricional, na busca pela compreensão dos efeitos dos nutrientes e dos CBA na regulação da homeostase metabólica de acordo com o genótipo individual. O desenvolvimento de equipamentos e técnicas mais acuradas contribuiu para o aumento do número de metabólitos que podem ser quantificados em uma única análise ou experimento, permitindo o monitoramento de centenas de compostos simultaneamente. Essa abordagem é essencial para análises sobre os efeitos de dietas complexas, alimentos, nutrientes ou CBA em organismos, pois, na maioria dos casos, a análise de um conjunto de biomarcadores é necessária para uma avaliação mais fidedigna.[5] A MS é essencial a essa análise, especialmente quando se utilizam espectrômetros de massa do tipo triplo quadrupolo, os quais possibilitam a análise simultânea de metabólitos por meio de reações múltiplas de monitoramento (MRM, *multiple-reaction monitoring*).

Este capítulo descreve alguns termos, equipamentos e técnicas, bem como um resumo dos estudos relacionados à metabolômica aplicada em estudos de genômica nutricional.

METABOLOMA E METABÓLITOS

Metaboloma é o conjunto de todos os metabólitos presentes em um organismo e, por isso, a sua determinação é, ao mesmo tempo, importante e difícil de ser realizada.[6] A metabolômica pode ser definida como uma ferramenta de análise de compostos de baixo peso molecular (metabólitos) presentes em amostras biológicas de um organismo, gerados por meio de suas vias metabólicas.[7] No contexto da metabolômica, biomarcador pode ser definido como um metabólito que melhor se correlaciona com variações genéticas de indivíduos submetidos a determinados fatores ambientais, sendo um indicador característico de processos biológicos normais ou patogênicos, bem como resultado de intervenções nutricionais ou farmacológicas.[8] Embora alguns biomarcadores já estejam bem definidos (p. ex., glicose e insulina plasmáticas e perfil lipídico), há um aumento crescente da necessidade de determinação de novos biomarcadores capazes de proporcionar melhor compreensão sobre o estado de saúde de indivíduos expostos a determinados padrões alimentares ou a tratamentos medicamentosos. Dessa forma, as abordagens holísticas na identificação de um maior número de metabólitos podem definir melhor a relação entre o ambiente e a homeostasia metabólica individual.[5]

De maneira geral, os metabólitos podem ser divididos em duas classes de compostos: solúveis em água ou hidrofílicos (nucleotídeos, açúcares, aminoácidos e carboidratos) e não solúveis em água ou hidrofóbicos (lipídios, carotenoides, como o licopeno, e vitaminas insolúveis em água, como a vitamina E e seus isômeros). Os principais componentes da classe dos lipídios são os ácidos graxos, destacando-se os poli-insaturados (PUFA, *polyunsaturated fatty acids*) ômega-3 e ômega-6. Dentre a família dos ômega-3 destacam-se os ácidos alfa linolênico (ALA), docosaexaenoico (DHA) e ecosapentaenoico (EPA). Já na família dos ômega-6 destacam-se os ácidos linoleico e araquidônico.[4] Os lipídios destacam-se nesse contexto de forma especial por estarem envolvidos em inúmeros processos bioquímicos. A avaliação desses compostos pode ser considerada uma subárea da metabolômica, conhecida como lipidômica.

A análise metabolômica pode ser realizada para avaliação e quantificação de metabólitos presentes em diferentes amostras biológicas, como sangue total, soro, plas-

ma, urina, saliva, tecidos, extratos e culturas celulares. Entretanto, a maioria dos estudos avalia a urina e/ou sangue (soro ou plasma).

A avaliação de um número expressivo de metabólitos somente foi possível com os avanços no desenvolvimento de equipamentos e técnicas de análise. Atualmente, duas técnicas principais são utilizadas para a determinação dos metabólitos: RMN e MS. Esta última pode estar acoplada à cromatografia gasosa (CG-MS, *cromatography gas coupled mass spectrometry*), à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-MS, *high performance liquid cromatography coupled mass spectrometry*) ou à cromatografia líquida de ultraeficiência (UPLC-MS, *ultra performance liquid cromatography coupled mass spectrometry*).[3] A partir da obtenção de dados de metabolômica, é possível a determinação de um *fingerprinting* (impressão digital) ou perfil metabólico, que é essencial para a compreensão sobre o estado de saúde de um indivíduo ou dos resultados de uma intervenção nutricional específica (Figura 35.3). As duas técnicas mais amplamente utilizadas nos estudos de metabolômica e suas vantagens e desvantagens estão descritas a seguir.

Figura 35.3 Aplicações da metabolômica na área da nutrição. RMN: ressonância magnética nuclear; CG/MS (*Cromatography Gas Coupled Mass Spectrometry*): cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas; LC/MS (*Liquid Cromatography Coupled Mass Spectrometry*): cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa. **Fonte:** adaptada de Gibbons et al.[1]

MÉTODOS DE ANÁLISE EM METABOLÔMICA

Ressonância magnética nuclear

A RMN foi uma das tecnologias pioneiras na análise de metabólitos. Resumidamente, essa técnica baseia-se na análise dos ^{1}H (hidrogênios) e/ou do ^{13}C (carbono) presentes nas moléculas para determinação dos compostos. Entretanto, em razão da complexidade de amostras biológicas, como a urina e o plasma, bem como da estrutura molecular do analito a ser determinado, são necessários equipamentos que realizem experimentos mais complexos. Tais equipamentos são capazes de executar avaliações mais aprofundadas sobre as relações entre os átomos ^{13}C e ^{1}H (RMN bidimensional). A RMN é uma técnica robusta, que apresenta variação muito baixa se comparada a outras técnicas de análise. Além disso, as amostras não sofrem destruição e podem ser novamente utilizadas na confirmação dos resultados obtidos. Contudo, sua baixa sensibilidade é uma desvantagem, especialmente quando comparada à espectrometria de massa. Atualmente, a RMN é amplamente empregada em análise de tecidos ou células intactas, graças aos experimentos de HRMAS (^{1}H *High Resolution Magic Angle Spinning*), capazes de identificar diretamente compostos provenientes de tais amostras.[9]

Espectrometria de massas

A MS baseia-se na determinação da relação massa/carga (*m/z*) de moléculas ionizadas. Seu acoplamento com as técnicas cromatográficas possibilita a análise de ampla variedade de classes de compostos, aumentando, dessa forma, a possibilidade de sua aplicação nas análises metabolômicas. Os principais métodos de ionização em espectrometria de massa acoplados à cromatografia líquida compreendem o *electrospray* (ESI, *electron spray ionization*), a ionização química à pressão atmosférica (APCI, *atmospheric pressure chemical ionization*) e a ionização por eletrofótons (APPI, *atmospheric pressure photoionization*). Por outro lado, os métodos de ionização dos compostos nas análises por CG-MS mais utilizados são o impacto eletrônico e a ionização por chama.[3]

Essas técnicas são amplamente utilizadas nos estudos de metabólitos e, mais recentemente, nos estudos envolvendo a análise de compostos provenientes das vias metabólicas de nutrientes. Os compostos voláteis e termoestáveis são mais facilmente analisados por CG-MS, enquanto os não voláteis necessitam de reações de derivatização (inserção de outras moléculas capazes de volatilizar compostos) para serem analisados por CG-MS. Entretanto, essa prática aumenta o tempo de análise e reduz a especificidade do método.[10]

Tanto o HPLC-MS quanto o UPLC-MS são técnicas amplamente empregadas na análise de compostos não voláteis e termoestáveis, solúveis em água e em solventes orgânicos, e são capazes de determinar compostos de baixo ou alto peso molecular e em ampla faixa de polaridade. Para as separações utilizando-se o HPLC são empregadas colunas cromatográficas com tamanho de partícula de 3 a 5 mcm, diâmetro de 3 a 4,6 mm e comprimento de 50 a 250 mm, com fluxos de fase móvel entre 0,5 e 1,5 mL/min. Embora a HPLC ainda seja considerada uma das melhores técnicas cromatográficas, com o advento do UPLC, mudanças significativas ocorreram no tempo de análise, no poder de separação, na economia de fase móvel e na sensibilidade das metodologias. Uma das diferenças mais significativas entre o HPLC e o UPLC, sem dúvida, é o tamanho das partículas da fase estacio-

nária. Enquanto no HPLC as colunas apresentam partículas na ordem de 3 a 5 mcm, no UPLC as partículas são bem menores, inferiores a 2 mcm. Essa mudança resulta em alta resolução, com picos cromatográficos mais bem definidos e separações mais eficientes.[3] Nas seções seguintes, outros equipamentos de espectrometria de massa serão abordados, de acordo com a análise a que se destinam em estudos de genômica nutricional.

ABORDAGEM METABOLÔMICA EM GENÔMICA NUTRICIONAL

Estratégias de análise utilizando ressonância magnética nuclear em estudos de genômica nutricional

Estudos intervencionais

As aplicações da RMN na análise de metabólitos, em estudos que envolvem abordagens nutricionais, têm aumentado consideravelmente, resultando em grande número de publicações sobre o tema. Em geral, três estratégias principais estão sendo utilizadas nas pesquisas de metabólitos no campo nutricional: estudos intervencionistas, identificação de biomarcadores alimentares e estudos de doenças relacionadas à alimentação.

A metabolômica aplicada aos estudos intervencionistas em nutrição pode revelar os mecanismos envolvidos na metabolização de uma dieta específica e o impacto que esta vai gerar em diferentes vias metabólicas. Em um estudo clínico conduzido com trinta indivíduos agrupados por baixo ou alto grau de ansiedade, a RMN foi essencial para a determinação de moléculas envolvidas no estresse e no metabolismo energético. O tratamento diário com 40 g de chocolate amargo (74% de cacau) durante catorze dias resultou em redução da excreção urinária de cortisol e catecolaminas (adrenalina, dopamina e 3-metoxitirosina) nos indivíduos com alto grau de ansiedade. Além disso, houve modulação, em ambos os grupos, das concentrações de glicina, transaconitato, prolina, beta-alanina e citrato, indicando fortes evidências de que uma intervenção nutricional pode alterar de forma rápida e significativa o metabolismo humano.[11]

Moazzami et al.[12] identificaram, por meio de análises de RMN, concentrações séricas diminuídas dos aminoácidos leucina e isoleucina e aumentadas de betaína e N,N-dimetilglicina em mulheres na pós-menopausa com colesterol total elevado, após a alteração da ingestão de pão de trigo refinado para o pão integral de centeio (consumo de, no mínimo, 20% do valor energético total diário) durante oito semanas seguidas. Esses resultados permitiram a conclusão de que o consumo de pão integral de centeio promove mudanças favoráveis no metabolismo de aminoácidos de cadeia ramificada, bem como no metabolismo de um carbono, amenizando um padrão metabólico plasmático associado com o desenvolvimento de diabete melito tipo 2 (DM2).

Em estudo sobre o impacto do aleitamento materno comparado a fórmulas industrializadas, com alto teor proteico, em bebês a termo de mães com sobrepeso ou obesas, foi possível comprovar a utilidade das análises por RMN. Foram determinados metabólitos associados ao crescimento do bebê na urina e nas fezes; os principais resultados estão sumarizados na Figura 35.4. Os autores concluíram que a determinação de perfis metabolômicos, de forma não invasiva a partir de urina e fezes, pode monitorar a resposta metabólica e as necessidades de bebês durante o crescimento, auxiliando no desenvolvimento de fórmulas com efeitos semelhantes ao leite materno.[13]

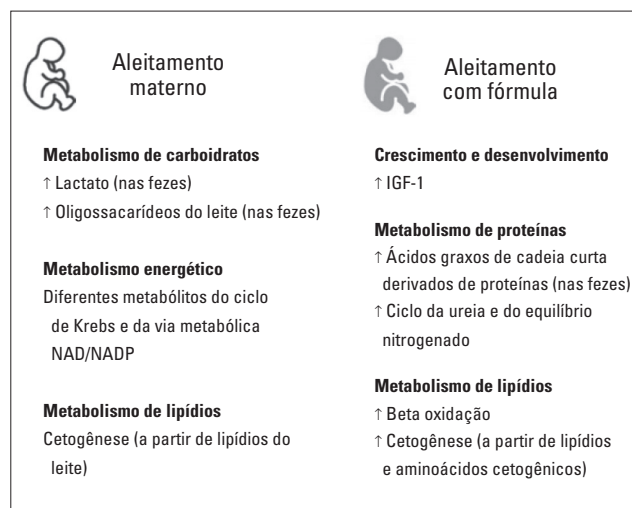



Figura 35.4 Esquema resumindo principais diferenças metabólicas entre crianças com aleitamento materno e alimentadas com fórmula. IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina 1. NAD: nicotinamida adenina dinucleotídeo; NADP: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosforilada. **Fonte:** adaptada de Martin et al.[13]

Embora a RMN seja uma técnica confiável e com baixas variações entre as análises, ela apresenta baixa sensibilidade. Assim, pesquisadores estão utilizando outras técnicas de análise em conjunto, como o acoplamento com equipamentos de cromatografia líquida e espectrômetros de massa, evitando, dessa forma, identificações e quantificações duvidosas que possam comprometer a determinação de alterações sutis na via metabólica, especialmente nos estudos de intervenção nutricional.[9]

Biomarcadores alimentares

A RMN aplicada aos estudos de metabolômica tem identificado uma série de biomarcadores correlacionados ao consumo de alimentos. É amplamente aceito que os

biomarcadores alimentares são essenciais para a avaliação de dietas específicas e para a elucidação das vias de metabolização dos nutrientes. Heinzmann et al.[14] publicaram um artigo no qual utilizaram ^{1}H RMN com o objetivo de identificar biomarcadores de ingestão de frutas cítricas. Os autores demonstraram que o metabólito prolina betaína é um excelente biomarcador da ingestão de frutas cítricas. De fato, as concentrações de prolina betaína nas frutas foi equivalente à sua cinética de excreção e, consequentemente, ao seu metabolismo em humanos, caracterizando-o como um biomarcador que pode ser utilizado como forma de avaliação do consumo de alimentos específicos.

Alguns estudos têm observado o aumento das concentrações de determinados metabólitos em dietas ricas em carne vermelha, como a 1-metil-histidina e a 3-metil-histidina, tornando-as biomarcadores em potencial.[15-17] Stella et al.[17] aplicaram a ^{1}H RMN para caracterizar os efeitos de três dietas distintas: vegetariana, com alto teor de proteínas e com baixo teor proteico. As análises revelaram que, com o aumento da ingestão proteica (dieta rica em carnes vermelhas), houve aumentos das concentrações urinárias de creatina, carnitina, acetil-carnitina e TMAO (N-óxido de trimetilamina). Por outro lado, nas dietas com baixo teor proteico e vegetariana, uma assinatura metabólica pôde ser observada com o aumento das concentrações de p-hidroxifenilacetato (cometabólito da flora intestinal humana). Esse estudo mostrou o potencial de utilização rotineira de biomarcadores nos estudos de genômica nutricional e da influência das dietas no metabolismo humano.

Doenças relacionadas à alimentação

A metabolômica tem contribuído extensivamente para o entendimento da etiologia de certas doenças, como o DM2 e as doenças cardiovasculares. Nesse sentido, as análises por RMN são essenciais para a identificação de metabólitos envolvidos em tais condições.

Dados da coorte Intermap Study (*International Study of Macro/micronutrients and Blood Pressure*) indicam maior predominância de hipertensão arterial, hipercolesterolemia e infartos, bem como número maior de tabagistas e de IMC alterado, em chineses do norte em comparação com os chineses do sul. Entretanto, as razões para tais diferenças não foram determinadas em um primeiro momento.[18] Por meio da análise por ^{1}H RMN da urina de 523 chineses do norte e de 244 chineses do sul, foram identificadas concentrações aumentadas de metabólitos importantes, sabidamente relacionados com risco aumentado de doenças cardiovasculares, nos indivíduos do norte chinês (dimetilglicina, alanina, lactato, aminoácidos de cadeia ramificada: leucina, isoleucina e valina, glicoproteínas N-acetiladas, ácidos pentanoico e heptanoico e metilguanidina). Por outro lado, metabólitos importantes relacionados à dieta e ao estilo de vida mais saudáveis foram encontrados em concentrações mais elevadas nos indivíduos do sul chinês, como os cometabólitos da microbiota intestinal: hipurato, 4-cresilsulfato, fenilacetilglutamina, 2-hidroxi-isobutirato; succinato, creatina, *scyllo*-inositol, prolinabetaína e *trans*-aconitato. Pôde-se observar nesse estudo relações importantes entre a influência do meio ambiente (alimentação e estilo de vida) e concentrações urinárias aumentadas de metabólitos relacionados ao risco de doenças cardiovasculares.[19]

Alguns estudos têm revelado relações importantes entre o aumento plasmático de aminoácidos de cadeia ramificada e a predisposição ao desenvolvimento do DM2. Würtz et al.[20] publicaram um estudo de seis anos de acompanhamento com 1.680 jovens adultos. Por meio de análises de RMN, foi possível concluir que concentrações plasmáticas aumentadas dos aminoácidos leucina, isoleucina, valina, fenilalanina e tirosina estão significativamente associadas ao desenvolvimento de resistência à insulina e, consequentemente, ao risco do desenvolvimento de DM2.

Assim, publicações recentes demonstram que a espectroscopia de RMN tem emergido como técnica confiável para investigações em genômica nutricional.[9] Entretanto, a MS também é uma alternativa para determinações de metabólitos e biomarcadores em estudos que envolvem nutrição. Um dos principais desafios atuais da metabolômica é a determinação de um número expressivo de compostos para avaliação de uma assinatura metabólica (ou de um perfil metabólico) que represente fidedignamente o estado nutricional de um indivíduo ou mesmo de uma população. Para investigação metabolômica em genômica nutricional utilizando a MS, atualmente três principais estratégias podem ser desenvolvidas: metabolômica inespecífica ou de abordagem ampla, metabolômica-alvo ou específica e metabolômica *in situ* ou tecido/órgão específica.[4]

Estratégias de análise utilizando a espectrometria de massas nos estudos de genômica nutricional

Metabolômica inespecífica

A metabolômica de abordagem ampla ou inespecífica é utilizada quando se deseja fazer uma varredura da composição molecular dos alimentos, caracterizar fenótipos metabólicos de um indivíduo ou investigar os resultados das intervenções nutricionais no metabolismo hu-

mano. Quando se utiliza a metabolômica de abordagem ampla, as amostras biológicas são submetidas a uma varredura, sem que se conheça quais substâncias serão encontradas e quais destas serão metabólitos.[4]

Para que esse tipo de identificação seja realizada, é necessária a utilização de equipamentos com alto poder de resolução, como os espectrômetros de massa com analisadores dos tipos quadrupolos, armadilha de íons (IT, *ions-trap*), tempo de voo (TOF, *time of flight*), transformada de Fourier aplicada a ressonância ciclotrônica de íons (FT-ICR, *Fourier-transform ion cyclotron resonance*) ou *orbitrap*. Esses analisadores podem estar acoplados em sequência em alguns modelos de espectrômetros disponíveis comercialmente (p. ex., o tempo de voo acoplado ao triplo quadrupolo (QTOF-MS/MS) ou o triplo quadrupolo acoplado à armadilha de íons (QTRAP-MS/MS). Esse acoplamento aumenta consideravelmente o nível de resolução e exatidão na identificação dos compostos ou metabólitos.[3]

A investigação tem início com a separação dos metabólitos da matriz biológica (plasma, soro, sangue ou urina), por meio de técnicas como as extrações líquido-líquido, sólido-líquido ou precipitação de proteínas. Em seguida, esses compostos podem ser separados por HPLC, UPLC ou CG e, em seguida, são submetidos ao espectrômetro de massa para análise. Dependendo de como a extração das amostras biológicas é realizada, a infusão direta no espectrômetro de massa também pode ser realizada. Entretanto, a separação não é obrigatória, uma vez que o alto poder de resolução desses espectrômetros torna desnecessária a separação prévia dos compostos por cromatografia.

Como dezenas ou até mesmo centenas de metabólitos serão avaliados ao mesmo tempo, a análise estatística para confirmação de dados significativos é primordial. Fatores como a massa exata, o tempo de retenção dos compostos e a concentração e modos de ionização, quando submetidos à análise estatística utilizando ferramentas computacionais específicas, podem facilitar a identificação e a quantificação dos metabólitos. A maioria dos *softwares* que controlam o espectrômetro de massa possui as ferramentas estatísticas necessárias para essa análise. Para a confirmação dos resultados, não é rara a utilização de espectros com alta resolução, bem como a pesquisa em bancos de dados e a comparação com padrões de referência dos metabólitos.[21]

Em 2010, Castro-Perez et al.[22] desenvolveram e validaram uma metodologia para determinação de lipídios plasmáticos em pacientes com osteoartrite aguda e moderada, utilizando um espectrômetro de massa QTOF-MS/MS. Por meio da abordagem *shotgun* (análise de uma classe de metabólitos utilizada para monitorar alterações específicas em amostras que possam ou não conter esses compostos), os pesquisadores desenvolveram uma metodologia capaz de monitorar 275 lipídios (das classes dos ácidos graxos: ésteres do colesterol, fosfolipídios, mono, di e triacilgliceróis) que constituíram a varredura do perfil lipídico das amostras. Houve aumento considerável das razões entre as concentrações dos fosfolipídios LPC (16:0 + 18:0) / PC (36:4 + 38:4) no grupo de pacientes diagnosticados com osteoartrite aguda em relação aos do grupo controle. Nos pacientes diagnosticados com osteoartrite moderada não houve alterações significativas da razão entre os lipídios avaliados. Esses resultados comprovam as alterações no metabolismo lipídico em pacientes com osteoartrite aguda, doença na qual existe elevação da atividade de fosfolipases que hidrolisam os grupamentos acila de fosfolipídios, gerando esse aumento significativo nas razões das concentrações dessa classe de metabólitos.

Com relação a alimentos, informações a respeito de compostos oriundos do metabolismo de plantas comestíveis, bem como suas concentrações e conformações estruturais, são essenciais para o entendimento de seus efeitos biológicos na promoção da saúde humana. Como exemplo, podem-se citar a quantificação e caracterização precisas de elagitaninos e do ácido elágico conjugados em alimentos, bebidas e suplementos alimentares. Entretanto, essa avaliação é difícil e complexa, especialmente em razão da dificuldade de obtenção de padrões analíticos puros e metodologias que consigam manter esses compostos na sua forma nativa, evitando alterações químicas em sua estrutura. Nesse sentido, Gasperotti et al.[23] desenvolveram uma metodologia analítica em UPLC-QTOF-HDMS (*ultraperformance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight-high-definition mass spectrometry*) e HPLC-DAD (*high-performance liquid chromatography-diode-array detector*) para determinação de elagitaninos e ácido elágico em frutas provenientes de onze pomares diferentes em Trentino, na Itália. Com isso, conseguiram determinar vinte estruturas inéditas de elagitaninos e quatro estruturas conjugadas do ácido elágico em frutas do gênero Rubus (amora-preta e framboesa), evidenciando diferenças significativas desses compostos de acordo com o modo de cultivo.

Metabolômica-alvo

A metabolômica-alvo é uma abordagem quantitativa de metabólitos conhecidos, determinados por meio de substâncias de referência e, em alguns casos, também pela comparação em banco de dados, disponíveis em *softwares* específicos ou mesmo em *websites* como:

- http://www.hmdb.ca/.
- http://www.genome.jp/kegg/.

- http://metacyc.org/.
- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank.
- http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/.
- http://www.ebi.ac.uk/chebi/.
- http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do.
- http://www.uniprot.org/.

Essa abordagem é realizada a partir da análise de metabólitos específicos, frequentemente associados a determinada via metabólica. A escolha de classes específicas de compostos, como aminoácidos, ácidos graxos, fosfolipídios ou acilcarnitinas, é essencial para a aplicação dessa estratégia e, consequentemente, para a elucidação das alterações tanto nas concentrações desses metabólitos quanto nas vias metabólicas em que são produzidos.

Geralmente, são utilizados espectrômetros de massa mais simples, mas não menos sensíveis, com analisadores do tipo triplo quadrupolo (MS/MS) capazes da realização de experimentos de MRM. Esse tipo de experimento é capaz de analisar simultaneamente centenas de metabólitos, com alta capacidade seletiva, diminuindo consideravelmente os erros de identificação de metabólitos similares, frequentes em vias metabólicas específicas (Figura 35.5). Alguns laboratórios já disponibilizam comercialmente *kits* de determinação de centenas de metabólitos divididos em classes de compostos químicos (Quadro 35.1).

Giordano et al.[24] sugeriram que análises em HPLC--ESI-MS/MS podem ser empregadas para determinação de uma série de aminoácidos úteis para a avaliação de alterações metabólicas em recém-nascidos (equivalente ao teste do pezinho). O intuito dessa abordagem é reduzir o tempo de análise e aumentar significativamente a eficiência e a robustez da metodologia.

Estudos anteriores utilizavam a derivatização das moléculas dos aminoácidos antes de sua determinação, o que aumenta o tempo de análise e diminui a seletividade da metodologia, além de aumentar os custos e expor os analistas a reagentes tóxicos. A metodologia sugerida provou ser altamente sensível e específica, permitindo o monitoramento de quarenta aminoácidos em sua forma nativa, sem necessidade de derivatizá-los. Também foi possível a determinação de alguns isômeros desses aminoácidos, os quais são importantes no diagnóstico de alterações em vias metabólicas. A seguir, foi publicado artigo referente ao desenvolvimento e validação de outra metodologia, em UPLC-ESI-MS/MS, para dosagem de acilcarnitinas, também em recém-nascidos. A metodologia validada foi capaz de determinar 48 acilcarnitinas, sendo relevante na confirmação de diagnósticos de doenças relacionadas a alterações metabólicas.[25]

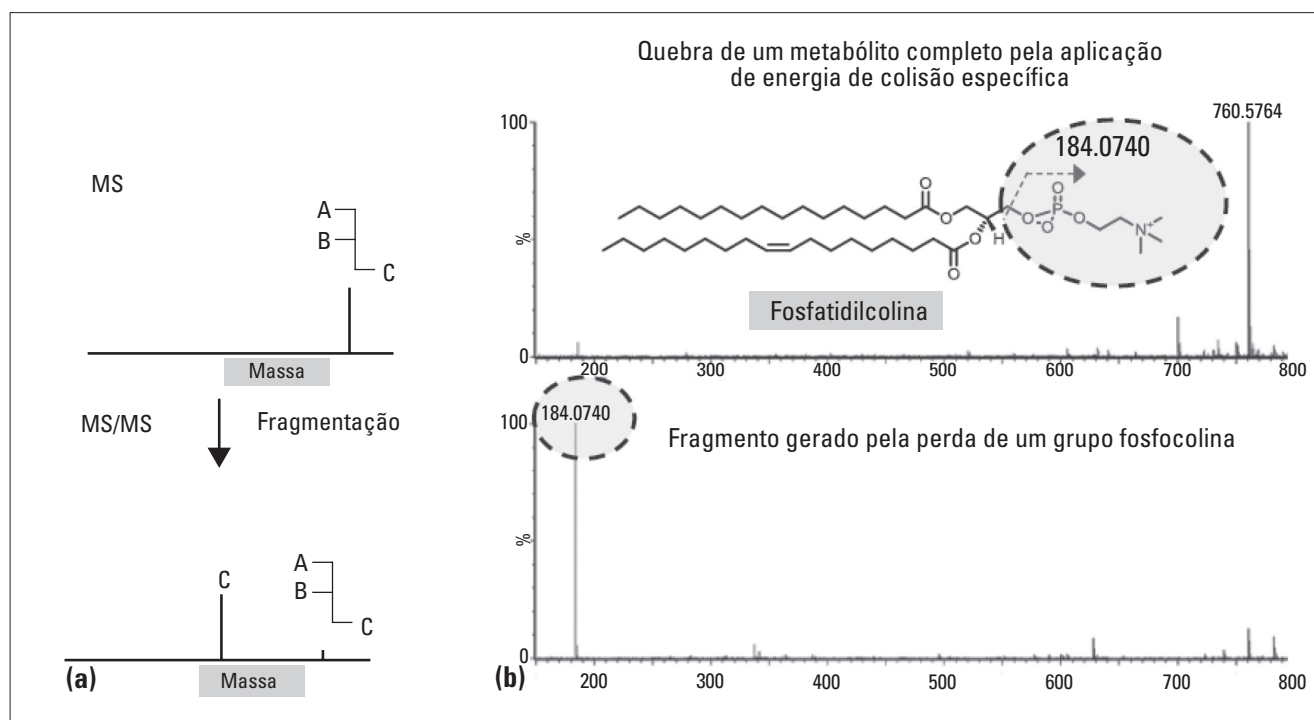



Figura 35.5 Elucidação estrutural. A estrutura química de metabólitos complexos pode ser caracterizada utilizando ferramentas modernas baseadas em espectrometria de massa (MS). (a) Aplicação de energia de alta colisão (MS/MS), divide estruturas complexas em partes que as constituem (A, B, C), a partir das quais se pode deduzir a estrutura original do metabólito de interesse. (b) Neste exemplo, a identificação de uma molécula de fosfatidilcolina baseia-se na observação de um fragmento característico (fosfocolina) produzido mediante a dissociação induzida por colisão usando um sistema híbrido: tempo de voo acoplado ao espectrofotômetro triplo quadrupolo (QTOF-MS/MS). **Fonte:** adaptada de Astarita e Langridge.[4]

Quadro 35.1 Metabólitos analisados por laboratórios comerciais

Classe de metabólitos	Quantidade	Relevância bioquímica
Aminoácidos	14	Metabolismo de aminoácidos e neurotransmissores; ciclo da ureia; gliconeogênese e glicólise; sensibilidade à insulina
Hexoses	1	Metabolismo de carboidratos
Carnitina	1	Metabolismo de carboidratos
Acilcarnitina	26	Consumo de energia; transporte e oxidação de ácidos graxos; estresse oxidativo; danos à membrana mitocondrial
Hidroxi e carboxia-cilcarnitinas	14	Consumo de energia; transporte e oxidação de ácidos graxos; estresse oxidativo; danos à membrana mitocondrial
Esfingo-mielinas	10	Cascatas de sinalização e danos à membrana celular, como a neurodegeneração
Hidroxiesfingomielinas	5	Cascatas de sinalização e danos à membrana celular, como a neurodegeneração
Diacilfosfatidilcolinas	38	Dislipidemias; danos à membrana celular; perfil de ácidos graxos e atividade das dessaturases
Acil-alquilfosfatidilcolinas	39	Dislipidemias; danos à membrana celular; perfil de ácidos graxos e atividade das dessaturases
Lisofosfatidilcolinas	15	Degradação de fosfolipídios, danos à membrana celular, cascatas de sinalização; perfil de ácidos graxos
Total	163	

Além da avaliação em fluidos biológicos, a metabolômica-alvo pode ser útil para avaliação de CBA, sendo essencial para elucidação do vínculo entre a ingestão de uma classe de substâncias presentes em determinado alimento, como os compostos fenólicos, e os benefícios que estes apresentam sobre a saúde individual. Nesse sentido, em 2012 foi publicado artigo que utilizou a metabolômica-alvo para determinação de 135 compostos fenólicos nos extratos de frutas, chá e vinho, como os benzoatos, fenilpropanoides, cumarinas, estilbenos, di-hidrochalconas e flavonoides. As determinações foram realizadas por meio de UPLC-MS/MS, utilizando o experimento de MRM, essencial para a análise simultânea de um número elevado de compostos. O método foi aplicado com êxito a diversos alimentos, como maçã, amora, chá-verde e vinho tinto, proporcionando ferramenta valiosa para avaliação da qualidade e quantidade de polifenóis desses alimentos.[26]

Metabolômica *in situ*

A abordagem metabolômica *in situ* baseia-se na determinação de metabólitos em tecidos específicos. Os metabólitos estão localizados em concentrações distintas nos tecidos de determinado órgão e essa distribuição desequilibrada geralmente não é elucidada quando se utilizam protocolos tradicionais de preparação de amostras nas análises metabolômicas, como as descritas anteriormente. Para esse tipo de determinação são utilizados espectrômetros de massa com fontes de dessorção de íons, como a dessorção e ionização a *laser* assistida por matriz (MALDI, *matrix-assisted desorption ionization*) e a dessorção e ionização por *electrospray* (DESI, *desorption electrospray ionization*).

De maneira simplificada, a geração de íons na MALDI ocorre quando um feixe de *laser* vaporiza as moléculas de uma amostra (p. ex., uma seção congelada de um tecido). Os íons contidos nesse vapor são diretamente introduzidos nos analisadores, nos quais as massas exatas dos metabólitos são determinadas, gerando um mapa topográfico de distribuição do composto no tecido (MS *imaging*).

Há poucos estudos em humanos e a maioria das investigações lipidômicas analisaram diferentes tecidos *ex vivo* em modelos animais.[27,28] Dentre os poucos trabalhos, Hart et al.[29] utilizaram a MALDI-MS/MS para determinação de lipídios em células da pele humana. Nesse sentido, as principais classes de compostos analisados foram as de glicerofosfolipídios e de esfingolipídios. Os resultados foram considerados padrão de distribuição normal desses lipídios dentro das células humanas. Isso poderá servir de base para comparação entre o perfil lipídico normal e de tecidos que sofreram alterações, como a sensibilização da pele por alimentos potencialmente alergênicos. A MALDI-MS torna-se, assim, uma ferramenta de análise poderosa, capaz de gerar compreensões mais profundas sobre os processos de absorção, distribuição e metabolização de componentes derivados dos alimentos e seus efeitos sobre a fisiologia humana essenciais nos estudos de genômica nutricional.

Com relação à DESI, um solvente na forma de *spray* é aplicado na superfície da amostra, retirando as moléculas dos compostos e formando os íons que são introduzidos diretamente nos analisadores de massas. Essa técnica permite análises em tempo real, podendo ser utilizada para avaliação qualitativa de traços dos metabólitos. A DESI é uma ferramenta eficaz de análise que permite avaliações da composição química da superfície de uma amostra por meio da espectrometria de massa, promovendo diversidade ampla de aplicações, como nas análises *in vivo*, no controle de qualidade de produtos farmacêuticos, em proteômica, em análises forenses (detecção de explosivos) e nas análises metabolômicas em animais e plantas.

Tata et al.[30] desenvolveram uma técnica baseada na DESI-MS para determinação de metabólitos secundários em batatas germinadas. É bem estabelecido que os vegetais produzem muitos compostos na tentativa de combater patógenos invasores. Entretanto, o entendimento da complexidade das interações patógenos-planta é um desafio para os estudos de metabolômica. Nesse sentido, o estudo baseou-se na determinação de glicoalcaloides, produzidos pelas batatas germinadas, quando infectadas pelo fitopatógeno *Phithium ultimum*. Após oito dias de inoculação, ocorreu diminuição significativa dos glicoalcaloides alfa-solanina (*m/z* 706) e alfa-chaconina (*m/z* 722) e aumento de solanidina (*m/z* 398), solasodenona (*m/z* 412), solanaviol (*m/z* 430), solasodieno (*m/z* 396), solaspiralidina (*m/z* 428), gama-solanina/gama-chaconina (*m/z* 560), beta-solanina (*m/z* 706) e beta-chaconina (*m/z* 722). Ao longo do experimento, com o progresso da doença, caracterizado pelo desenvolvimento de lesões necróticas marrons nas batatas, houve redução progressiva de todos os glicoalcaloides produzidos para o combate ao fitopatógeno.

Como visto anteriormente, as estratégias e técnicas de abordagem metabolômica nos estudos de alimentos e intervenções nutricionais são variadas e destinadas a determinações específicas, dependendo do resultado que se deseja alcançar e da matriz a ser analisada. Assim, essas análises englobam desde determinações dos metabólitos em fluidos e tecidos corporais humanos e animais até determinações dos compostos no próprio alimento. A metabolômica pode, ainda, ser aplicada intensamente em estudos de genômica nutricional.

GENÔMICA NUTRICIONAL E METABOLÔMICA

As concentrações plasmáticas de metabólitos traduzem os processos biológicos que acontecem no organismo. Alterações no padrão ou na concentração de determinados compostos podem ser associadas a desequilíbrios homeostáticos que, por sua vez, estão relacionados a condições clínicas ou doenças. De maneira geral, pode-se presumir que a razão entre as concentrações do substrato e o produto de algumas reações enzimáticas pode refletir alterações nas rotas de conversão de vias metabólicas. Essas alterações, em muitos casos, estão associadas a variações genéticas individuais, como os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP, *single nucleotide polymorphism*), em especial aqueles relacionados a genes envolvidos no metabolismo de lipídios, carboidratos e proteínas.

Nesse sentido, estudos de associação ampla do genoma (GWAS, *genome wide association studies*) correlacionam o aparecimento ou as mudanças na concentração de determinados metabólitos à presença de um ou mais SNP. Estudos populacionais utilizando grande número de participantes, como o Kora (Kooperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg) da Alemanha e o TwinsUK da Inglaterra, entre outros, têm relatado resultados relevantes nessas associações.[31]

A seguir, uma rápida explicação sobre a construção das siglas dos metabólitos auxiliará a compreender melhor sobre os resultados dos estudos descritos posteriormente. A composição das cadeias laterais dos lipídios são abreviadas como $C_{x:y}$, em que x representa o número de carbonos da cadeia lateral e y, o número de duplas ligações. Por exemplo, PC ae $C_{33:1}$ corresponde a uma acil-alquil (ae) fosfatidilcolina (PC) composta de 33 carbonos nas cadeias laterais de ácido graxo e uma única dupla ligação (*www.biocrates.com/products/research-products/absoluteidq-p150-kit*).

Como o número de amostras e metabólitos analisados nesses estudos é muito alto, algumas empresas desenvolveram *kits* que facilitam expressivamente as análises. Assim, por exemplo, o laboratório Biocrates Life Science (Innsbruck, Áustria) comercializa *kits* para determinação de centenas de metabólitos, como o *AbsoluteIDQ p150 kit*, capaz de avaliar 163 compostos endógenos, como aminoácidos, hexoses, acilcarnitinas ($C_{x:y}$), hidroxilacilcarnitinas ($C(OH)_{x:y}$), dicarboxilacilcarnitinas ($C_{x:y}$-DC), esfingomielinas ($SM_{x:y}$), N-hidroxilaciloilesfingosil-fosfocolina ($SM(OH)_{x:y}$), fosfatidilcolina (PC, aa=diacil, ae=acil-alquil) e lisofosfatidilcolina. A disponibilidade comercial dessas análises é essencial, pois torna viável a aplicação da análise metabolômica em estudos populacionais e de intervenção.

Nesse sentido, Illig et al.[31] utilizaram a prestação de serviços da Biocrates e investigaram 1.029 amostras (509 de homens e 520 de mulheres) provenientes de indivíduos da coorte KORA F4 (formada por 3.080 indivíduos entre 2006 e 2008 dos 4.261 da coorte original KORA S4 recrutada entre 1999 e 2001) residentes no sul da Alemanha, com idade entre 32 e 81 anos. O intuito dos pesquisadores foi confirmar dados de um estudo anterior,[32] realizado em 284 homens também participantes do KORA, que encontrou relação entre variações genéticas que dão origem a fenótipos metabólicos específicos e claramente diferenciados, que os autores chamaram de "metabotipos geneticamente determinados".

Dessa forma, para tal confirmação, foram avaliados quantitativamente 163 metabólitos no soro dos pacientes. Dentre os principais resultados estiveram as razões entre as concentrações das fosfatidilcolinas PC aa $C_{36:2}$/PC aa $C_{38:1}$ e PC aa $C_{36:3}$/PC aa C_{36}, as quais foram fortemente associadas ao SNP rs174547 no gene *FADS1*. O SNP rs9393903 no gene *ELOVL2* foi significativamente associado à razão das concentrações de PC aa $C_{40:3}$/PC aa $C_{42:5}$. Esses dois genes estão envolvidos na biossíntese de

ácidos graxos poli-insaturados e, consequentemente, nas alterações bioquímicas do perfil lipídico. Outros genes e seus respectivos SNP estão envolvidos na betaoxidação de ácidos graxos e em alterações do perfil lipídico. Nesse sentido, o SNP rs2014355 no gene *ACADS* foi associado à razão das acilcarnitinas C_3/C_4, o SNP rs2286963 no *ACADL* apresentou associação com a razão $C_9/C_{10:2}$ e o SNP rs211718 no *ACADM* foi associado à razão C_{12}/C_{10}. O rs603424 no gene *SCD*, envolvido na síntese de ácidos graxos, foi fortemente associado à razão $C_{14}/C_{16:1}$ e o rs8396 do gene *ETFDH*, envolvido na metabolização de lipídios e proteínas, foi fortemente associado à razão das concentrações de $C_{14:1}$-OH/C_{10}.[31]

Outros resultados interessantes do mesmo estudo sugerem que a biossíntese de fosfolipídios está fortemente relacionada às razões entre SM(OH) $C_{24:1}$/SM $C_{16:0}$, as quais foram significativamente associadas ao rs168622 do gene *SPTLC3*. Foram encontradas fortes associações entre as razões das concentrações de PC aa $C_{36:2}$/PC aa $C_{38:1}$ e o rs964184 que ocorre no *cluster APOA1-APOC3-APOA4-APOA5* que, por sua vez, está fortemente associado às concentrações plasmáticas de triacilgliceróis. As razões nas concentrações entre PC ae $C_{34:2}$/PC aa $C_{32:2}$, associadas à presença do rs1260326 no gene *GCKR*, modularam inversamente as concentrações de glicose de jejum e de triacilgliceróis (associação fraca). As razões nas concentrações de triptofano e fenilalanina associadas ao rs10830963 no gene do receptor de malatonina (*MTNR1B*) também se mostraram envolvidas nas concentrações de glicose de jejum.[31]

Traços metabólicos das razões entre aracdonato $C_{20:4\,n6}$/di-homo-linolenato $C_{20:3n3}$ ou C_{n6} também foram fortemente associados ao rs174547 no gene *FADS1*. Já o rs2066938 no gene *ACADM* esteve associado à razão butirilcarnitina/propionilcarnitina, enquanto o rs211718 foi significativamente associado à razão entre hexanoilcarnitina/oleato.[33]

Nos últimos anos, as associações entre fatores genéticos e ambientais revelaram importantes avanços na compreensão do acúmulo de gordura visceral correlacionado com o estresse oxidativo mediado pelo processo inflamatório e distúrbios metabólicos. Nesse sentido, a metabolômica configura-se como ferramenta importante para elucidação da predisposição à obesidade. Em um estudo de coorte, quarenta mulheres obesas entre 25 e 40 anos de idade, com IMC entre 28 e 40 kg/m^2, foram submetidas à análise das condições clínicas de saúde e monitoradas durante duas semanas em relação ao acúmulo de gordura visceral e perfil metabólico no sangue e urina. Metabólitos importantes foram fortemente associados ao acúmulo de gordura visceral, destacando-se dois aminoácidos: tirosina e glutamina, e cinco fosfatidilcolinas: PC-O $C_{44:6}$, PC-O $C_{44:4}$, PC-O $C_{42:4}$, PC-O $C_{40:4}$ e PC-O $C_{40:3}$.[34]

A ingestão de alimentos está fortemente associada às modificações nas vias metabólicas do organismo humano. Dietas diferenciadas podem resultar no aparecimento de metabólitos específicos. Nesse sentido, Bouchard-Mercier et al.[35] elencaram metabólitos de fosfatidilcolina (PC) de relevância conhecida em dois grupos distintos: PC1 contendo acilcarnitinas de cadeia média e longa ($C_{16:2}$, $C_{14:2}$, $C_{14:2}$-OH, C_{16}, $C_{14:1}$-OH, $C_{14:1}$, $C_{10:2}$, C_5-DC/C_6-OH, C_{12}, $C_{18:2}$, C_{10}, $C_{4:1}$-DC/C_6, $C_{8:1}$ e C_2) e PC2 contendo aminoácidos e acilcarnitinas de cadeia curta (xLeu, Met, Arg, Phe, Pro, Orn, His, C_0, C_3, C_4 e C_5). Em seguida, realizaram a análise desses metabólitos em indivíduos que apresentavam dietas distintas: *prudent dietary* (composta, em geral, de alta ingestão de hortaliças, frutas, grãos integrais e gorduras não hidrogenadas e baixa ingestão de grãos refinados) e *Western dietary* (composta de alta ingestão de grãos refinados, sobremesas, doces e carnes processadas). A *Western dietary* foi associada negativamente ao aparecimento de metabólitos do grupo PC1 e positivamente aos do grupo PC2.

Em avaliação mais específica, foi possível identificar que os metabólitos do grupo PC2 foram negativamente correlacionados com a ingestão de frutas e positivamente associados à ingestão de sobremesas e gorduras saturadas. Associações positivas nas concentrações de C_5-DC/C_6-OH (glutaril-L-carnitina) e de $C_{18:2}$ (octadecadienil-L-carnitina) foram relacionadas à *prudent dietary*, enquanto as concentrações de Met e Phe foram associadas positivamente à ingestão da *Western dietary*. A ingestão de hortaliças e frutas foi positivamente associada à $C_{18:2}$ e inversamente associadas a xLeu. O consumo de frutas foi inversamente associado à Met. A ingestão de gorduras não hidrogenadas foi positivamente associada a $C_{14:1}$ (tetradecadienil-L-carnitina) e $C_{18:2}$ e inversamente associada à His. O consumo de sobremesas foi positivamente associado a três aminoácidos: Met, Phe e xLeu. O consumo de açúcares foi associado às concentrações de Met, $C1_{8:1}$-OH (hidroxioctadecenoil-L-carnitina) e $C_{5:1}$-DC (glutaconil-L-carnitina).[35]

Ao observar a ingestão de macronutrientes, as gorduras saturadas apresentaram associação positiva com as concentrações de C_5 (valeril-L-carnitina) e inversamente com as concentrações de $C_{18:2}$. Gorduras monoinsaturadas foram associadas positivamente com $C_{18:1}$ (octenoil-L-carnitina) e inversamente com C_5-M-DC (metilglutaril-L--carnitina). Gorduras poli-insaturadas foram inversamente associadas com C5-M-DC e positivamente com as concentrações de Pro e $C_{10:2}$ (decadienil-L-carnitina). Os percentuais de ingestão de proteínas em relação ao valor energético total foram associados com Orn e His. Entretanto, para ingestão de carboidratos foi observada correlação inversa nas concentrações de Orn.[35] De maneira inte-

ressante, os resultados desse estudo indicam biomarcadores metabólicos da ingestão de nutrientes provenientes de diferentes padrões alimentares relacionados ao risco do desenvolvimento de doenças.

Nesse sentido, altas concentrações de leucina, arginina, valina, prolina, fenilalanina, isoleucina e lisina foram fortemente associadas ao risco do desenvolvimento de hipertrigliceridemia (independente do DM2). Os GWAS revelaram numerosos *loci* associados às concentrações plasmáticas de triacilgliceróis, porém menos de 10% dessas variações genéticas explicam a predisposição à hipertrigliceridemia. Ainda nesse estudo, as concentrações alteradas de C_3-acilcarnitina também foram fortemente associadas à hipertrigliceridemia.[36]

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para uma melhor avaliação sobre como o indivíduo está respondendo a um padrão alimentar específico, é necessária a descoberta de biomarcadores capazes de refletir de maneira mais precisa o consumo de alimentos e padrões alimentares específicos. Os métodos para avaliação de uma dieta específica geralmente estão associados a erros, frequentemente causados pela dificuldade de relato fidedigno dos alimentos e quantidades consumidas, escolhas errôneas nos tamanhos das porções e mudanças não relatadas do consumo dos alimentos, além de discrepâncias entre as tabelas de composição química de alimentos e *softwares* para análise da alimentação. Assim, as análises metabolômicas surgem como uma possibilidade de avaliação da ingestão alimentar, por meio da investigação de metabólitos em amostras biológicas, e possibilitam análises de associação entre o genótipo, o ambiente e o fenótipo. Dessa forma, poderão contribuir para descobertas em favor de uma nutrição individualizada com vistas à promoção da saúde.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gibbons H, O'Gorman A, Brennan L.Metabolomics as a tool in nutritional research. Curr Opin Lipidol. 2015;26(1):30-4.
2. Zhang A, Sun H, Wang X. Saliva metabolomics opens door to biomarker discovery, disease diagnosis, and treatment. Appl Biochem Biotechnol. 2012;168(6):1718-27.
3. Bujak R, Struck-Lewicka W, Markuszewski MJ, Kaliszan R. Metabolomics for laboratory diagnostics. J Pharm Biomed Anal. 2015;113:108-20.
4. Astarita G, Langridge J. An Emerging Role for Metabolomics in Nutrition Science. J Nutrigenet Nutrigenomics. 2013;6(4-5):181-200.
5. Claus SP, Swann JR. Nutrimetabonomics:applications for nutritional sciences, with specific reference to gut microbial interactions. Annu Rev Food Sci Technol. 2013;4:381-99.
6. Kaput J, Rodriguez RL. Nutritional genomics discovering the path to personalized nutrition. New York: Wiley; 2006.
7. Patti GJ, Yanes O, Siuzdak G. Metabolomics: the apogee of the omic triology. Nat Rev Mol Cell Biol. 2012;13(4):263-9.
8. Rubio-Aliaga I, Kochhar S, Silva-Zolezzi I. Biomarkers of nutrient bioactivity and efficacy: a route toward personalized nutrition. J Clin Gastroenterol. 2012;46(7):545-54.
9. Brennan L. NMR-based metabolomics: from sample preparation to applications in nutrition research. Prog Nucl Magn Reson Spectrosc. 2014;83:42-9.
10. Gouveia MJ, Brindley PJ, Santos LL, Correia da Costa JM, Gomes P, Vale N. Mass spectrometry techniques in the survey of steroid metabolites as potential disease biomarkers: a review. Metabolism. 2013;62(9):1206-17.
11. Martin FP, Rezzi S, Pere-Trepat E, Kamlage B, Collino S, Leibold E et al. Metabolic effects of dark chocolate consumption on energy, gut microbiota, and stress-related metabolism in free-living subjects. J. Proteome Res. 2009;8:5568-79.
12. Moazzami AA, Bondia-Pons I, Hanhineva K, Juntunen K, Antl N, Poutanen K et al. Metabolomics reveals the metabolic shifts following an intervention with rye bread in postmenopausal women: a randomized control trial. Nutr J. 2012;11:88.
13. Martin FP, Moco S, Montoliu I, Collino S, Da Silva L, Rezzi S et al. Impact of breast-feeding and high- and low-protein formula on the metabolism and growth of infants from overweight and obese mothers. Pediatr Res. 2014;75(4):535-43.
14. Heinzmann SS, Brown IJ, Chan Q, Bictash M, Dumas ME, Kochhar S et al. Metabolic profiling strategy for discovery of nutritional biomarkers: proline betaine as a marker of citrus consumption. Am J Clin Nutr. 2010;92(2):436-43.
15. Cross AJ, Major JM, Sinha R. Urinary biomarkers of meat consumption. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2011;20(6):1107-11.
16. Dragsted LO. Biomarkers of meat intake and the application of nutrigenomics. Meat Sci. 2010;84(2):301-7.
17. Stella C, Beckwith-Hall B, Cloarec O, Holmes E, Lindon JC, Powell J et al. Susceptibility of human metabolic phenotypes to dietary modulation. J Proteome Res. 2006;5(10):2780-8.
18. Zhao L, Stamler J, Yan LL, Zhou B, Wu Y, Liu K et al. Blood pressure differences between northern and southern Chinese: role of dietary factors: the International Study on Macronutrients and Blood Pressure. Hypertension. 2004;43(6):1332-7.
19. Yap IK, Brown IJ, Chan Q, Wijeyesekera A, Garcia-Perez I, Bictash M et al. Metabolome-wide association study identifies multiple biomarkers that discriminate north and southChinese populations at differing risks of cardiovascular disease: INTERMAP study. J Proteome Res. 2010;9(12):6647-54.
20. Würtz P, Soininen P, Kangas AJ, Rönnemaa T, Lehtimäki T, Kähönen M et al. Branched-chain and aromatic amino acids are predictors of insulin resistance in young adults. Diabetes Care. 2013;36(3):648-55.
21. Chaleckis R, Ebe M, Pluskal T, Murakami I, Kondoh H, Yanagida M. Unexpected similarities between the Schizosaccharomyces and human blood metabolomes, and novel human metabolites. Mol Biosyst. 2014;10(10):2538-51.
22. Castro-Perez JM, Kamphorst J, DeGroot J, Lafeber F, Goshawk J, Yu K, Shockcor JP, Vreeken RJ, Hankemeier T. Comprehensive LC-MS E lipidomic analysis using a shotgun approach and its application to biomarker detection and identification in osteoarthritis patients. J Proteome Res. 2010;9(5):2377-89.
23. Gasperotti M, Masuero D, Vrhovsek U, Guella G, Mattivi F. Profiling and accurate quantification of Rubus ellagitannins and

ellagic acid conjugates using direct UPLC-Q-TOF HDMS and HPLC-DAD analysis. J Agric Food Chem 2010;58:4602-16.
24. Giordano G, Di Gangi IM, Gucciardi A, Naturale M. Quantification of underivatised amino acids on dry blood spot, plasma, and urine by HPLC-ESI-MS/MS. Methods Mol Biol. 2012;828:219-42.
25. Gucciardi A, Pirillo P, Di Gangi IM, Naturale M, Giordano G. A rapid UPLC-MS/MS method for simultaneous separation of 8 acylcarnitines in dried bloodspots and plasma useful as a second-tier test for expanded newborn screening. Anal Bioanal Chem. 2012;404(3):741-51.
26. Vrhovsek U, Masuero D, Gasperotti M, Franceschi P, Caputi L, Viola R et al. A versatile targeted metabolomics method for the rapid quantification of multiple classes of phenolics in fruits and beverages. J Agric Food Chem. 2012;60(36):8831-40.
27. Chen Y, Allegood J, Liu Y, Wang E, Cachón-Gonzalez B, Cox TM et al. Imaging MALDI mass spectrometry using an oscillating capillary nebulizer matrix coating system and its application to analysis of lipids in brain from a mouse model of Tay-Sachs/Sandhoff disease. Anal Chem. 2008;80(8):2780-8.
28. Gross V, Carlson G, Kwan AT, Smejkal G, Freeman E, Ivanov AR et al. Tissue fractionation by hydrostatic pressure cycling technology: the unified sample preparation technique for systems biology studies. J Biomol Tech. 2008;19(3):189-99.
29. Hart PJ, Francese S, Claude E, Woodroofe MN, Clench MR. MALDI-MS imaging of lipids in ex vivo human skin. Anal Bioanal Chem. 2011;401(1):115-25.
30. Tata A, Perez CJ, Hamid TS, Bayfield MA, Ifa DR. Analysis of metabolic changes in plant pathosystems by imprint imaging DESI-MS. J Am Soc Mass Spectrom. 2015;26(4):641-8.
31. Illig T, Gieger C, Zhai G, Römisch-Margl W, Wang-Sattler R, Prehn C, Altmaier E, Kastenmüller G, Kato BS, Mewes HW, Meitinger T, de Angelis MH, Kronenberg F, Soranzo N, Wichmann HE, Spector TD, Adamski J, Suhre K. A genome-wide perspective of genetic variation in human metabolism. Nat Genet. 2010;42(2):137-41.
32. Gieger C, Geistlinger L, Altmaier E, Hrabé de Angelis M, Kronenberg F, Meitinger T et al. Genetics meets metabolomics: a genome-wide association study of metabolite profiles in human serum. PLoS Genet. 2008;4(11):e1000282.
33. Suhre K, Shin SY, Petersen AK, Mohney RP, Meredith D, Wägele B et al. Human metabolic individuality in biomedical and pharmaceutical research. Nature. 2011;477(7362):54-60.
34. Martin FP, Montoliu I, Collino S, Scherer M, Guy P, Tavazzi I et al. Correction: topographical body fat distribution links to amino acid and lipid metabolism in healthy non-obese women. PLoS One. 2013;8(9).
35. Bouchard-Mercier A, Rudkowska I, Lemieux S, Couture P, Vohl MC. The metabolic signature associated with the Western dietary pattern: a cross-sectional study. Nutr J. 2013;12:158.
36. Mook-Kanamori DO, Römisch-Margl W, Kastenmüller G, Prehn C, Petersen AK, Illig T et al. Increased amino acids levels and the risk of developing of hypertriglyceridemia in a 7-year follow-up. J Endocrinol Invest. 2014;37(4):369-74.

Métodos para avaliação do consumo alimentar habitual em estudos de genômica nutricional

36

Dirce Maria Lobo Marchioni
Josiane Steluti
Aline Martins de Carvalho
Regina Mara Fisberg

INTRODUÇÃO

Novos desafios surgiram na pesquisa em nutrição após o sequenciamento do genoma humano, principalmente no que diz respeito à relação risco-benefício dos nutrientes e compostos bioativos dos alimentos na saúde. O conhecimento advindo da identificação das variações do genoma humano oferece o potencial de predizer, reduzir o risco ou manipular as consequências fisiológicas ou patológicas das diferenças genéticas individuais.[1-3] As variações genéticas têm influência na suscetibilidade humana às doenças, nas necessidades individuais de nutrientes, nas intolerâncias alimentares, na eficiência dos medicamentos, na resposta inflamatória, na longevidade e praticamente em todos os fenótipos humanos.[2] Da mesma forma, a resposta à ingestão de determinado nutriente não é a mesma para cada indivíduo, em razão das interações existentes entre metabolismo, ambiente e genética.[3] Dessa forma, determinado nível de ingestão de um nutriente pode representar risco ou benefício para alguns indivíduos, mas não para outros.

O fenótipo do indivíduo é o resultado da complexa interação entre seu genótipo e a exposição ambiental, da qual a alimentação representa parte significativa. A ingestão de nutrientes e de compostos bioativos de alimentos é uma exposição que pode, comprovadamente, modificar a funcionalidade e a estabilidade do genoma, mas cuja ação pode ser modificada por variações genéticas.[4] Assim, a ingestão alimentar é uma exposição ambiental crítica quando se considera o efeito de fatores genéticos no risco de doenças.

No entanto, a alimentação é, certamente, um dos atributos individuais mais difíceis de serem avaliados em razão de sua complexidade e variedade inerentes.[5] Se, por um lado, os métodos e técnicas para a análise do genoma tiveram avanços relevantes, a avaliação da ingestão alimentar permanece desafiadora, pois a maior parte dos métodos ainda é baseada no relato individual e sujeita a erros. Dessa forma, a avaliação da alimentação requer cuidado particular para a obtenção de dados válidos, visto que há um elenco de métodos e técnicas com graus variados de validade.[6]

O interesse na avaliação da ingestão alimentar pode ser em nível individual; para aplicações clínicas; ou de populações, em estudos epidemiológicos. A seleção do método para mensurar a ingestão alimentar requer, em qualquer dos casos, a definição clara dos objetivos a serem alcançados,[6,7] podendo ser estabelecidos três diferentes objetivos: avaliação quantitativa da ingestão de nutrientes; avaliação do consumo de alimentos ou grupos alimentares, e avaliação do padrão alimentar individual.[7]

A avaliação da ingestão alimentar compreende a estimativa de todos os alimentos e bebidas consumidos por via oral[8] e, geralmente, envolve três etapas: a coleta da informação dos tipos de alimentos, o registro da quantidade ingerida (eventualmente, da frequência de alimentos ingeridos) e a conversão da ingestão de alimentos em valores de energia e de nutrientes a partir de tabelas de composição de alimentos. Portanto, tem-se uma medida indireta do valor nutricional da alimentação.[9,10]

Porém, não devem ser utilizados dados de apenas um dia de ingestão alimentar para monitorar ou avaliar um indivíduo ou população, uma vez que a alimentação varia ao longo dos dias e das estações do ano. Assim, um conceito fundamental na investigação da ingestão alimentar e de seus efeitos na saúde é o de dieta habitual, definida como a ingestão média avaliada por um grande número de dias.[11] O número de dias pode ser estimado com base na informação prévia da variação da ingestão inter e intraindividual na população de interesse.[12] Em

contraposição, a alimentação durante um período relativamente curto é conhecida como dieta atual.[13]

MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR

Métodos para coleta de dados dietéticos podem ser classificados em duas categorias: de curto ou longo prazo. Os métodos de curto prazo coletam informação no momento corrente, e podem ser relativos ao registro da alimentação do dia anterior (Recordatório Alimentar de 24 horas – R24h) ou pela utilização de um registro da alimentação por um período de um a vários dias (Registro Alimentar – RA). Os métodos de longo prazo coletam dados referentes à dieta habitual em relação a um tempo pregresso, que pode variar de um a poucos meses até anos, sendo o questionário de frequência alimentar (QFA) o mais utilizado. Cada método tem seus pontos fortes e fracos, vantagens e desvantagens. A seguir, são apresentados, resumidamente, características e pontos fundamentais dos principais métodos.

Recordatório alimentar de 24 horas

O R24h consiste em definir e quantificar todos os alimentos e bebidas ingeridos no período anterior à entrevista, que podem ser as 24 horas precedentes ou, mais comumente, o dia anterior[13,14] e, portanto, fornece informação sobre a dieta atual. A informação obtida por este método é influenciada pela capacidade do indivíduo em recordar e relatar de forma precisa seu consumo de alimentos, determinantes críticos da qualidade da informação. Entre os fatores que influenciam a memória estão a idade, a escolaridade, o humor, a atenção, a compreensão da importância da informação e a frequência da exposição.[15] A entrevista é estruturada, geralmente com perguntas específicas, que auxiliam o indivíduo a se recordar de todos os alimentos ingeridos ao longo do dia. Essas perguntas são especialmente úteis para coletar informações sobre o modo de preparo dos alimentos.

O R24h apresenta várias vantagens que o torna atraente para uso em monitoramento e em estudos epidemiológicos. Como é conduzido por um entrevistador, não é necessário que o respondente seja letrado. Em razão do imediatismo do período de recordação, os entrevistados são capazes de lembrar a maior parte de sua ingestão. Talvez um dos pontos mais importantes, no entanto, seja a possibilidade de aplicação em populações de diferentes etnias, o que o torna viável para uso em estudos em diferentes países ou regiões.[10,16] No entanto, a maior limitação do método R24h é que um único dia de recordatório não representa a ingestão habitual de um indivíduo. Essa limitação deve-se à elevada variabilidade da ingestão de nutrientes em diferentes dias, o que confere ao método R24h pouca representatividade da ingestão habitual se aplicado uma única vez[17]. Para contornar essa limitação, pode-se fazer a aplicação seriada, repetindo-se o inquérito. O número de repetições depende do nutriente de interesse. Além disso, técnicas estatísticas vêm sendo desenvolvidas para utilizá-lo em conjunto com outros métodos, a fim de melhorar a qualidade da informação da dieta habitual.

Registro alimentar ou diário alimentar

Da mesma forma que o R24h, o RA recolhe informações sobre a ingestão atual de um indivíduo ou de um grupo populacional. Nesse método, também conhecido como diário alimentar, o indivíduo anota, em formulários específicos, todos os alimentos e bebidas consumidos ao longo de um ou mais dias, devendo, também, anotar os alimentos consumidos fora do lar.[18]

A aplicação do RA, independentemente dos dias selecionados, deve ocorrer em dias alternados e abranger um dia de final de semana.[19] Pode ser aplicado de duas maneiras: na primeira, o indivíduo deve registrar o tamanho da porção ingerida; na segunda, todos os alimentos devem ser pesados e registrados antes de serem ingeridos e, da mesma maneira, as sobras devem ser pesadas e registradas. Essa última forma de aplicação é utilizada, em geral, em estudos nos quais é necessário estimar com precisão a ingestão de nutrientes ou de compostos bioativos, nem sempre disponíveis em tabelas de composição de alimentos. Em ambos os casos, o indivíduo registrará de forma detalhada o nome da preparação, os ingredientes que a compõem, a marca comercial do alimento e a forma de preparação.[20] O registro requer boa participação por parte dos respondentes, que devem estar motivados e letrados. A confiabilidade diminui ao longo dos dias de registro, pela fadiga dos participantes e, em especial, pela modificação do consumo alimentar decorrente do processo de registro, o que introduz um viés importante na estimativa.[6] Normalmente, o método é aplicado por um período de três, cinco ou sete dias, pois tempos maiores que uma semana podem comprometer a adesão e a fidedignidade dos dados.

Questionário de frequência alimentar

O QFA tem sido amplamente utilizado em grandes estudos epidemiológicos, que consideram fatores como custo, logística da coleta de dados e análise do inquérito alimentar. O QFA é composto de uma lista de alimentos predefinida e por uma seção com a frequência de con-

sumo em um período específico (número de vezes que o indivíduo consome determinado alimento por dia, semana, mês ou ano). Alguns questionários podem também conter informações sobre o tamanho da porção do alimento em medidas caseiras, como referência. A escolha dos alimentos que compõem a lista é dirigida pela hipótese do estudo (alimentos e/ou alimentos fonte de nutrientes que se deseja investigar) e por outros procedimentos metodológicos.[16,21] É necessário, ainda, que o QFA seja elaborado especificamente para a população de estudo e tenha sua acurácia e precisão avaliadas, o que inclui procedimentos complexos e relativamente demorados.[22]

Ressalta-se que o QFA pode ser apropriado para estabelecer uma ordenação da ingestão alimentar, porém raramente apresenta acurácia suficiente para uso quando se necessita estabelecer medidas acuradas da ingestão alimentar. Em primeiro lugar, não há uma quantificação direta das porções consumidas pelo indivíduo, pois assume-se uma porção média para todos os indivíduos do grupo ou as opções de porções são limitadas a poucas categorias, como pequeno, médio ou grande.[23] Segundo, o QFA tem uma lista finita de alimentos e, portanto, não é capaz de contemplar todos aqueles consumidos pelos indivíduos. Os alimentos são limitados àqueles considerados como os de maior contribuição para os nutrientes investigados.[24] Dessa forma, o QFA não deve ser considerado a primeira opção em estudos de interação genes-nutrientes, uma vez que as vias metabólicas são afetadas pelos nutrientes. Como os polimorfismos genéticos afetam apenas subgrupos da população, é fundamental que a estimativa da ingestão individual seja a mais precisa possível.[25]

O Quadro 36.1 apresenta resumidamente as principais vantagens e desvantagens dos métodos de inquérito alimentar segundo objetivos da avaliação do consumo em estudos de genômica nutricional.

Quadro 36.1 Vantagens e desvantagens dos métodos de inquérito alimentar segundo objetivos da avaliação do consumo alimentar

	Avaliação quantitativa da ingestão de nutrientes	
	Vantagens	*Desvantagens*
Recordatório de 24 horas	Rápida aplicação Não altera a ingestão alimentar Pode ser utilizado em qualquer faixa etária e em indivíduos não letrados Baixo custo	Depende da memória do entrevistado Depende da capacidade do entrevistador em estabelecer boa comunicação e em evitar a indução de respostas Um único recordatório não estima a dieta habitual A ingestão relatada pode ser atípica
Diário alimentar ou registro alimentar	As anotações são feitas no momento do consumo Não depende da memória Menor erro quando há orientação detalhada para o registro Mede o consumo atual Identifica tipos de alimentos e preparações consumidos e horários das refeições	Consumo pode ser alterado, pois o indivíduo sabe que está sendo avaliado Requer que o indivíduo saiba ler e escrever Há dificuldade de estimar as porções Exige alto nível de motivação e colaboração Menor adesão de pessoas do sexo masculino As sobras são computadas como alimento ingerido Requer tempo O indivíduo deve conhecer medidas caseiras
	Avaliação do consumo de alimentos ou grupos alimentares	
	Vantagens	*Desvantagens*
Questionário de frequência alimentar	Estima a ingestão habitual do indivíduo Não altera o padrão de consumo Baixo custo Classifica os indivíduos em categorias de consumo Elimina as variações de consumo do dia a dia A digitação e a análise dos inquéritos são relativamente simples, comparadas a outros métodos	Depende da memória sobre hábitos alimentares passados e de capacidades cognitivas para estimar o consumo médio em longo período pregresso Desenho do instrumento requer esforço e tempo Dificuldades para a aplicação conforme o número e a complexidade da lista de alimentos Quantificação pouco exata Não estima o consumo absoluto, visto que nem todos os alimentos consumidos pelo indivíduo podem constar na lista

Fonte: adaptada de Fisberg et al.[7]

BIOMARCADORES DA INGESTÃO DE NUTRIENTES

Em razão das dificuldades na obtenção dos dados relacionados à quantidade de nutrientes ingerida e à biodisponibilidade dos nutrientes ao organismo mediante os métodos com base no relato do consumo de alimentos pelos indivíduos, tem sido de grande interesse e necessidade o uso de marcadores bioquímicos que reflitam a quantidade ingerida e metabolizada de um nutriente.[26] Em grandes estudos epidemiológicos prospectivos, como o *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition* (Epic), além das informações dietéticas obtidas por questionários, foram coletadas também amostras de material biológico de milhares de pessoas em toda a Europa, a fim de investigar o papel da alimentação na saúde.[27]

Os biomarcadores de ingestão de nutrientes referem-se a dosagens de nutrientes em fluidos, tecidos e excreções corporais, além de fornecerem medida mais acurada e, em especial, mais objetiva da alimentação, pois não estão sujeitos à memória do indivíduo ou à sua capacidade de registrar o consumo alimentar.[26,28]

Os biomarcadores foram classificados por Kaaks et al.[29] em biomarcadores de recuperação e biomarcadores de concentração. Os primeiros baseiam-se em uma medida quantitativa absoluta da ingestão alimentar. Entretanto, poucos biomarcadores incluem-se nessa categoria, como a excreção urinária de 24 horas como medida do consumo diário total de proteína, e o uso da água duplamente marcada como medida da ingestão de energia, no contexto de equilíbrio energético.[11] Já os biomarcadores de concentração, que incluem medidas sanguíneas de diversos nutrientes, baseiam-se na medida da concentração de um composto específico em determinado momento no tempo. Uma característica dos biomarcadores de concentração é que a relação quantitativa entre ingestão e marcador pode variar substancialmente entre os indivíduos[30] e, portanto, raramente há uma relação direta entre o consumo e o valor do biomarcador, pois as concentrações de nutrientes podem variar de acordo com características individuais, tanto genéticas quanto ambientais, como tabagismo, presença de variantes genéticas relacionadas ao metabolismo, uso de medicamentos, consumo de álcool, entre outros. Alguns indicadores nutricionais são homeostaticamente controlados, por isso há pouca relação entre o consumo e o biomarcador. Além disso, alguns refletem o estado nutricional de longo prazo, como o selênio em unhas, e a composição de ácidos graxos nos tecidos, enquanto outros biomarcadores, como o sódio urinário e ácido fólico sérico, refletem o consumo recente.[13]

A maioria dos biomarcadores nutricionais requer coleta de sangue, urina ou outros tecidos biológicos, exigindo uma logística muitas vezes trabalhosa e onerosa para coleta e análise. Além disso, os biomarcadores são específicos para determinados nutrientes, podendo não refletir as múltiplas dimensões da ingestão alimentar. Portanto, os biomarcadores são utilizados com maior frequência para validação e calibração de instrumentos de avaliação do consumo em estudos epidemiológicos.

Estudos envolvendo biomarcadores evidenciaram erros de medida substancial relacionados ao sub-relato em questionários, registros e recordatórios alimentares. Evidenciou-se, ainda, que os métodos de referência usados na grande maioria dos estudos de validação e calibração apresentavam erros correlacionados com o instrumento analisado e, portanto, violavam os pressupostos exigidos.[31] Assim, a integração de biomarcadores nos estudos de validação é recomendada, quando possível, por possibilitar melhor estimativa do erro de medida, pelo uso de métodos como o das tríades.[32,33] No Brasil, Slater et al.[34] utilizaram esse método para validar a estimativa de ingestão de carotenoides, frutas e hortaliças por meio de um QFA. No momento atual, os biomarcadores adicionam informações sobre a ingestão alimentar, mas não substituem os métodos tradicionais.

Com o sequenciamento do genoma humano, surgem novas disciplinas, como a metabolômica, que estuda o conjunto de todos os metabólitos produzidos e/ou modificados por um organismo, considerando sua dinâmica, composição, interação e resposta a intervenções ou alterações no ambiente, em células, tecidos ou fluidos biológicos. Essa ciência oferece o potencial, especialmente na área de avaliação nutricional, de identificar metabólitos envolvidos em condições clínicas, como na obesidade,[35] no diabete[36] e na doença arterial coronariana,[37] e em estudos envolvendo biomarcadores de ingestão alimentar.[38-40] Com o estudo dos metabólitos, pode-se esperar também maior clareza dos efeitos de fatores ambientais e genéticos em conjunto nos desfechos em saúde.[41-43]

TECNOLOGIAS EMPREGADAS NA AVALIAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR

Como progresso na área da avaliação do consumo alimentar, pode-se constatar também a utilização intensiva da tecnologia de informação no desenvolvimento de métodos para melhorar tal avaliação.[44] Tradicionalmente, essa avaliação tem sido realizada com métodos baseados no autorrelato do consumo de alimentos, quer seja por R24h, RA ou QFA, coletados em papel e, muitas vezes, analisados manualmente, usando informações de tabelas de composição de alimentos impressas.[45]

Avanços tecnológicos facilitaram o desenvolvimento de técnicas sofisticadas para registro, processamento e análise de dados alimentares, com o objetivo de reduzir os custos quanto à carga de trabalho, tendo em vista a quantidade e a complexidade desses dados.[45] O advento da digitalização óptica permitiu a coleta de dados dietéticos de grande número de pessoas participantes de estudos de coorte, utilizando-se QFA com leitura óptica. Com o progressivo acesso aos computadores pessoais, novos avanços tecnológicos permitiram a administração do QFA em computadores, reduzindo os custos de impressão e postagem.[46] No Brasil, Queiróz et al.[47] avaliaram a viabilidade de utilização da internet para aplicação de um QFA, porém houve baixa taxa de retorno (14%).

Outro avanço tecnológico foi o desenvolvimento de *softwares* que automatizaram as questões na entrevista conduzida para obtenção do R24h. A primeira experiência no desenvolvimento de uma metodologia padronizada para a coleta de dados individuais de consumo de alimentos foi iniciada pela Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (Iarc), para o estudo Epic. O Epic-Soft foi utilizado como método de referência para o estudo de calibração dos QFA utilizados nos 23 centros dos dez países

participantes do estudo.[48-52] Trata-se da condução da entrevista do R24h padronizada, dirigida por um menu, com abordagem de desenvolvimento voltada para minimizar erros de coleta e assegurar a elevada padronização na aplicação do método entre os centros participantes do estudo.[50] Recentemente, o Epic-Soft foi adaptado na Europa com vistas à padronização de metodologias para avaliação da ingestão alimentar em estudos,[53] incluindo o European Food Consumption Survey Method[54] e o projeto Dietary Exposure Assessments for Children in Europe (Expochi).[55] Está em andamento um estudo para o desenvolvimento da versão brasileira do *software*, apoiada pela Iarc, com o nome de Global-Diet.

Dois outros *softwares* de sistematização de entrevistas de uso amplo merecem destaque: o Nutrition Data System for Research (NDRS) e o Usda's Automated Multi-Pass Method (AMPM).[56] O primeiro tem sido utilizado nas pesquisas conduzidas no estudo ISA-Capital, Inquérito de Saúde no município de São Paulo.[57] Esses sistemas aprimoram a consistência das entrevistas, visto que as perguntas sobre o detalhamento dos alimentos e porções são padronizadas. Além disso, ambos seguem o processo AMPM, considerado o atual estado da arte em termos de instrumento para aplicação do R24h.[58] Nesse método, a ingestão é revisada mais de uma vez, no esforço de recuperar o consumo de alimentos esquecidos, de forma a aumentar a acurácia da medida e a reduzir o esforço dos entrevistados.[59]

O National Cancer Institute desenvolveu um R24h *online*, denominado ASA 24 (Automated Self Administered 24-hour). Tendo como base teórica o AMPM, foram feitas adaptações para aplicação autoadministrada no computador. O ASA 24 utiliza a mais atualizada tecnologia de automação para computadores, incluindo um tutorial, imagens gráficas e personagens animados para guiar os participantes, além do fornecimento de esclarecimentos por áudio. O instrumento é organizado a partir das refeições e o indivíduo seleciona os alimentos ingeridos no dia anterior, informando cada ocasião em que consumiu alimentos, hora da refeição e detalhes como métodos de preparo e adições aos alimentos. Para auxiliar na estimativa da quantidade consumida, são apresentados até oito fotografias digitais em sequência de tamanho. Fotos de utensílios utilizados para bebidas (copos, xícaras) incluem um cursor móvel, permitindo ao respondente indicar o percentual de bebida que foi efetivamente consumido. São dadas múltiplas oportunidades ao respondente de modificar ou editar a lista de alimentos. O *software,* que é de domínio público e está disponível para uso em pesquisas ou no ambiente clínico, tem a capacidade de estimar nutrientes e grupos de alimentos para cada recordatório em tempo real.[30]

Outro avanço é o Personal Digital Assistant (PDA) ou dispositivos eletrônicos móveis que fazem autogravação dos dados da ingestão alimentar,[44] podendo ajudar a reduzir ou a eliminar a subnotificação da ingestão energética, que é comum em avaliações assistidas por um entrevistador.

Pesquisas sugerem que a validade dos dados coletados para a avaliação alimentar com a ajuda de um PDA é comparável, mas não superior, à que é obtida por meio de um R24h.[60,61] Assim, é necessária a condução de mais estudos para avaliar a aplicabilidade dessas tecnologias em grandes estudos epidemiológicos. Entretanto, com novas tendências tecnológicas, espera-se que a precisão da avaliação do consumo alimentar melhore, visando à obtenção de associações mais fidedignas de interações genes-alimentação.[62]

VALIDADE: ERROS ASSOCIADOS À MEDIDA DA DIETA E TÉCNICAS PARA MINIMIZÁ-LOS E PREVENÍ-LOS

A análise da validade dos métodos de consumo alimentar é de fundamental importância nos estudos epidemiológicos.[63] O termo validade é geralmente definido como o grau com que um instrumento mede o que se propõe a medir, e diz respeito à acurácia da medida. Sabe-se que os métodos para mensuração do consumo alimentar não são livres de erros, os quais afetam sua acurácia e precisão.

Erros são geralmente categorizados como aleatórios e sistemáticos. Os erros sistemáticos podem reduzir a acurácia da medida dietética, resultando em sub ou superestimação da média de ingestão alimentar dos indivíduos, o que pode significar um viés da estimação em nível populacional. Já os erros aleatórios incluem a variação do dia a dia (variabilidade intrapessoal) e erros nas respostas e na quantificação, os quais podem gerar estimativas imprecisas de ingestão.[64] Os fatores que podem interferir na avaliação dos inquéritos alimentares, além de numerosos, são de natureza muito diversificada, afetando em maior ou menor grau a qualidade dos resultados.[65]

Os erros associados com a medida do consumo alimentar podem ser categorizados em três grupos: erros relativos ao entrevistado, ao entrevistador e ao método de inquérito utilizado para coletar e subsequentemente analisar a informação obtida. As interações entre esse sistema triangular podem, teoricamente, afetar a medida da ingestão alimentar e, dependendo do tipo de erro introduzido, o consumo pode ser subestimado ou superestimado.[8]

O indivíduo, em métodos que dependem da memória, pode tanto se esquecer de relatar os alimentos realmente consumidos (erros de omissão) como relatar alimentos que não foram ingeridos. Além disso, vários fatores interferem no processo cognitivo de recuperar e

recordar a informação: sexo, idade, nível educacional, grupo étnico ou ambiente do local da entrevista. A percepção do que é uma "alimentação saudável" também pode levar os indivíduos a omitir alimentos considerados nutricionalmente pobres ou a superestimar a ingestão de alimentos considerados "bons" para a saúde. Estudos mostram, ainda, que pessoas obesas tendem a subestimar sua ingestão alimentar sistematicamente.[66,67]

O entrevistador também pode ser fonte de erro. Fatores comportamentais como palavras utilizadas nas perguntas, reações verbais ou não verbais diante das respostas do entrevistado, inabilidade de promover uma relação empática e omissões de perguntas podem influenciar as respostas, introduzindo erros de difícil mensuração e controle.

Erros sistemáticos e aleatórios são também introduzidos em função do método utilizado para coletar, manipular e analisar os dados de inquéritos alimentares. Existem dificuldades inerentes à identificação correta dos alimentos, bem como à quantificação de receitas culinárias. Nos métodos que relatam eventos ocorridos no passado, como é o caso do R24h, o viés de memória é uma das grandes preocupações. Em contrapartida, nos métodos em que o consumo alimentar deve ser registrado no momento em que ocorre, como no RA, há a possibilidade de omissão de alimentos, bem como de mudança comportamental dos indivíduos durante o período de preenchimento do inquérito.[8,68] O QFA requer capacidades cognitivas do indivíduo, para lembrar o consumo dos itens alimentares listados no instrumento, distinguindo a frequência de consumo em um período pregresso – em geral, um ano – de forma que a resposta reflita a dieta habitual.[20]

Tanto os erros sistemáticos como os aleatórios podem ser minimizados pela introdução de mecanismos de controle em cada etapa do processo de coleta e análise de dados alimentares. O indivíduo responsável pela coleta de dados da alimentação deve ser previamente capacitado para utilização do método do inquérito, para não cometer erros durante o questionamento. A determinação de porções dos alimentos, com a utilização de material de apoio ou não, também deve ser objeto de treinamento, para que o profissional esteja familiarizado com os alimentos e preparações utilizadas na comunidade, assim como os utensílios utilizados para o preparo, distribuição e consumo dos alimentos (pratos, canecas, colheres etc.).[69]

A quantificação da ingestão de nutrientes requer o uso de tabelas de composição de alimentos e/ou *softwares* computadorizados[70-73] que auxiliarão na conversão dos dados de alimentos para energia e nutrientes. A acurácia dessas tabelas e dos *softwares* computacionais para acessá-las é outro ponto crítico. A obtenção de uma base de dados (tabela de composição centesimal ou *software*) precisa é fundamental para a identificação dos fatores relacionados à alimentação que podem ser determinantes para a redução do risco de doenças ou para a promoção da saúde em nível individual.

A variação no consumo alimentar do dia a dia (intrapessoal) é uma das principais fontes de erro, como demonstrado por vários estudos.[12,74,75] Essa variação distorce os percentis iniciais e finais da distribuição da ingestão, em razão do aumento da variância total da distribuição, e enfraquece medidas de associação entre alimentação e desfechos em saúde. Para obtenção da distribuição entre os indivíduos (interpessoal), que é a de interesse nos estudos epidemiológicos, é necessário replicar as medidas de inquérito. Em estudos epidemiológicos, replicar muitos R24h pode ser impraticável em função de custo e tempo. Uma alternativa é a obtenção de distribuições ajustadas pela atenuação da variação intrapessoal, utilizando-se métodos estatísticos, com destaque para o Multiple Source Method[76,77] e o método proposto por pesquisadores do National Cancer Institute (NCI).[78] Para o primeiro método, foi desenvolvida uma plataforma *online* (https://msm.dife.de) e, para o segundo, rotinas no pacote estatístico SAS estão disponíveis no *site* do NCI. A aplicação desses métodos requer pelo menos duas medidas independentes de avaliação do consumo alimentar em pelo menos uma subamostra da população estudada.[79]

APLICAÇÃO DOS MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DE CONSUMO EM ESTUDOS DE GENÔMICA NUTRICIONAL

Nos estudos de genômica nutricional, são várias as formas utilizadas para avaliação do consumo alimentar, com seus pontos fortes e fracos, conforme descrito ao longo do capítulo.

No Quadro 36.2 estão detalhados alguns trabalhos publicados recentemente de acordo com o tipo de estudo, o método de avaliação do consumo alimentar e os resultados obtidos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As doenças crônicas não transmissíveis constituem o maior problema global de saúde e têm gerado número elevado de mortes prematuras, pior qualidade de vida, com alto grau de limitação e incapacidade, além de serem responsáveis por impactos econômicos para famílias e comunidades, bem como para a sociedade em geral.[90-92] Fatores genéticos, ambientais e de estilo de vida vêm sendo relacionados a essas doenças, sendo a nutrição peça fundamental para a redução do risco de muitas delas. Apesar do consenso do papel da alimentação e da plausibilidade biológica dos seus efeitos na saúde, muitas vezes os estu-

Quadro 36.2 Exemplos de estudos de genômica nutricional e os métodos utilizados para avaliação do consumo alimentar

Estudo	País	Tamanho amostral	Método de avaliação de consumo	Resultado	Referência
Nurses' Health Study (NHS), Women's Genome Health Study (WGHS) e Health Professionals Follow-up Study (HPFS)	EUA	37.423 participantes	Questionário de frequência alimentar semiquantitativo	Interação entre consumo de alimentos fritos e escore genético composto de 32 SNP em relação à obesidade	Qi et al. (2014)[80]
HPFS, NHS e WGHS	EUA	37.423 participantes	Questionário de frequência alimentar semiquantitativo	Interação entre consumo de bebidas açucaradas e escore genético composto de 32 SNP em relação à obesidade	Qi et al. (2012)[81]
Pounds Lost	EUA	811 pessoas com excesso de peso	Registro alimentar, R24h por telefone e questionário de frequência alimentar	Participantes com dieta com alto teor de lipídios e carreadores do alelo variante do SNP no gene da proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP) apresentaram menores concentrações de triacilgliceróis e maiores de HDL-c em comparação com indivíduos com dieta pobre em gordura	Qi et al. (2014)[82]
Integral Education on Nutrition and Physical Activity (Evasyon) Study	Espanha	204 adolescentes com excesso de peso	Questionário de frequência alimentar semiquantitativo, previamente validado na Espanha	Foram identificadas as regiões do DNA diferencialmente metiladas dependendo da resposta em relação à perda de peso em adolescentes com excesso de peso	Moleres et al. (2013)[83]
Boston Puerto Rican Health Study (BPRHS)	EUA	995 adultos	Questionário de frequência alimentar desenhado para essa população	Consumo de ácidos graxos poli-insaturados modulou o efeito de duas variantes do gene *MTHFR* nas concentrações de homocisteína plasmática	Huang et al. (2011)[84]
Health Lifestyle in Europe by Nutrition in Adolescence (Helena)	Sete países europeus	573 adolescentes	R24h usando o HELENA Dietary Assessment Tool (HELENADIAT)	Consumo de ácido linolênico (ALA) modulou a associação entre *FADS* e concentrações de colesterol total e colesterol não HDL em adolescentes europeus	Dumont et al. (2011)[85]
HPFS, NHS e WGHS	EUA	33.355 participantes	Questionário de frequência alimentar semiquantitativo	SNP nos genes *FGF21*, *FTO* e próximo ao *TRAF* e foram associados com ingestão calórica proveniente de proteína e carboidratos	Chu et al. (2013)[86]
Predimed (Prevención con Dieta Mediterránea)	Espanha	7.052 indivíduos com alto risco cardiovascular	Questionário de frequência alimentar validado	A adesão à dieta mediterrânea modificou a associação entre SNP nos genes *FTO* e *MC4R* e risco de diabete tipo 2	Ortega-Azorín et al. (2012)[87]
Estudo transversal multicêntrico	Japão e China	136 japonenes e 179 chineses	Questionário de frequência alimentar para elaborar padrões por análise fatorial	Interação entre padrão da dieta e SNP (*VEGFR2*) afetou concentrações plasmáticas de lipídios	Yap et al. (2012)[88]
Caso-controle aninhado da coorte European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (Epic)	Itália	206 casos de infarto do miocárdio e 206 controles pareados	Questionário de frequência alimentar adaptado e validado especificamente para os hábitos alimentares italianos	Padrões de metilação de DNA em regiões específicas de genes do metabolismo de um carbono pareceram modular o risco de DCV conferido pela baixa ingestão de folato e vitaminas do complexo B	Fiorito et al., (2014)[89]

dos epidemiológicos trazem resultados controversos ou falham em demonstrar tais associações. Sabe-se que nutrientes, compostos bioativos de alimentos e genoma interagem reciprocamente: a variabilidade genética é responsável por diferenças na absorção e no metabolismo de nutrientes, enquanto nutrientes e compostos bioativos de alimentos podem efetivamente modificar a expressão, a estabilidade e a integridade do genoma. Compreender as interações que ocorrem entre os genes, incluindo todas as suas variantes genéticas, e as exposições ambientais, principalmente a alimentação, significa abrir caminho para o desenvolvimento de recomendações nutricionais que

considerem os genótipos, almejando a redução do risco de doenças e a promoção do bem-estar de indivíduos e populações nas diferentes fases da vida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Stover PJ, Caudill MA. Genetic and epigenetic contributions to human nutrition and health: managing genome-diet interactions. J Am Diet Assoc. 2008;108(9):1480-7.
2. Stover PJ. Human nutrition and genetic variation. Food Nutr Bull. 2007;28:S101-15.
3. Hesketh J, Wybranska I, Dommels Y, King M, Elliott R, Pico C et al. Nutrient-gene interactions in benefit–risk analysis. British Journal of Nutrition. 2006;95(06):1232-6.
4. Weinshilboum R. Inheritance and drug response. N Engl J Med. 2003;348(6):529-37.
5. Ensminger AH, Ensminger ME, Konlande JE, Robson JRK. The concise encyclopedia of foods & nutrition. Califórnia: CRC Press; 1995.
6. Tucker KL. Assessment of usual dietary intake in population studies of gene-diet interaction. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2007;17(2):74-81.
7. Fisberg RM, Marchioni DML, Colucci ACA. Avaliação do consumo alimentar e da ingestão de nutrientes na prática clínica. Arq Bras Endocrinol Metab. 2009;53:617-24.
8. Rutishauser IH. Dietary intake measurements. Public Health Nutr. 2005;8(7A):1100-07.
9. Gibson RS, Sazawal S, Peerson JM. Design and quality control issues related to dietary assessment, randomized clinical trials and meta-analysis of field-based studies in developing countries. J Nutr. 2003 Supl 1;133(5):1569S-73S.
10. Biró G, Hulshof KF, Ovesen L, Amorim Cruz JA. Selection of methodology to assess food intake. Eur J Clin Nutr. 2002 Supl 2;56:S25-32.
11. Freedman LS, Midthune D, Carroll RJ, Krebs-Smith S, Subar AF, Troiano RP et al. Adjustments to improve the estimation of usual dietary intake distributions in the population. J Nutr. 2004;134(7):1836-1843. Errata em: J Nutr. 2005;135(6):1524.
12. Verly Jr E, Fisberg RM, Cesar CL, Marchioni DM. Sources of variation of energy and nutrient intake among adolescents in São Paulo, Brazil. Cad Saude Publica. 2010;26(11):2129-37.
13. Gibson RS. Principles of nutritional assessment. Oxford: Oxford University Press; 1990.
14. Buzzard M. 24-hours dietary recall and food record methods. In: Willett WC. Nutritional epidemiology. 2.ed. Nova York: Oxford University Press; 1998.
15. Emmett P. Workshop 2: The use of surrogate reporters in the assessment of dietary intake. Eur J Clin Nutr. 2009 Supl 1;63:78-9.
16. Thompson FE, Subar AF. Dietary assessment methodology. In: Coulston AM, Boushey CJ. Nutrition in the prevention and treatment of disease. 2 ed. San Diego, CA: Academic Press; 2008.
17. Dodd KW, Guenther PM, Freedman LS, Subar AF, Kipnis V, Midthune D et al. Statistical methods for estimating usual intake of nutrients and foods: a review of the theory. J Am Diet Assoc. 2006;106:1640-50.
18. Thompson FE, Byers T. Dietary assessment resource manual. J Nutr. 1994;124(11 Suppl):2245S-317S.
19. Willett W. Nutrition epidemiology. 2 ed. Nova York: Oxford University Press; 1998.
20. Carpenter C. Dietary Assessment. In: Heber D, Blackburn GL, Go VLW, Milner J. Nutritional oncology. 2 ed. California: Elsevier; 2006.
21. Fisberg R, Marchioni DML, Slater B. Recomendações nutricionais. Inquéritos alimentares: métodos e bases científicos. Barueri: Manole; 2005.
22. Bingham SA, Nelson M. Assessment of food consumption and nutrient intake. In: Margetts BM, Nelson M. Design concepts in nutritional epidemiology. Oxford: Oxford University Press; 1997.
23. Kohlmeier L, Bellach B. Exposure assessment error and its handling in nutritional epidemiology. Annu Rev Public Health. 1995;16:43-59.
24. Block G, Hartman AM, Dresser CM, Carroll MD, Gannon J, Gardner L. A data-based approach to diet questionnaire design and testing. Am J Epidemiol. 1986;124(3):453-69.
25. Tucker KL, Smith CE, Lai CQ, Ordovas JM. Quantifying diet for nutrigenomic studies. Annu Rev Nutr. 2013;33:349-71.
26. Martini LA. Marcadores bioquímicos da ingestão alimentar. In: Fisberg RM, Slater B, Marchioni DML, Martini LA. Inquéritos alimentares: métodos e bases científicos. Barueri: Manole; 2005.
27. Riboli E. Nutrition and cancer: background and rationale of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (Epic). Ann Oncol. 1992;3(10):783-91.
28. Wild CP, Andersson C, O'Brien NM, Wilson L, Woods JA. A critical evaluation of the application of biomarkers in epidemiological studies on diet and health. Br J Nutr. 2001 Supl 1;86:S37-53.
29. Kaaks R, Ferrari P, Ciampi A, Plummer M, Riboli E. Uses and limitations of statistical accounting for random error correlations, in the validation of dietary questionnaire assessments. Public Health Nutr. 2002;5(6A):969-76.
30. Schatzkin A, Subar AF, Moore S, Park Y, Potischman N, Thompson FE et al. Observational epidemiologic studies of nutrition and cancer: the next generation (with better observation). Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2009;18(4):1026-32.
31. Day NE, Wong MY, Bingham S, Khaw KT, Luben R, Michels KB et al. Correlated measurement error: implications for nutritional epidemiology. Int J Epidemiol. 2004;33(6):1373-81.
32. Yokota RT, Miyazaki ES, Ito MK. Applying the triads method in the validation of dietary intake using biomarkers. Cad Saúde Pública. 2010;26(11):2027-37.
33. Willett W. Foreword. The validity of dietary assessment methods for use inepidemiologic studies. Br J Nutr. 2009 Supl 1;102:S1-2.
34. Slater B, Enes CC, López RV, Damasceno NR, Voci SM. Validation of a food frequency questionnaire to assess the consumption of carotenoids, fruits and vegetables among adolescents: the method of triads. Cad Saúde Pública. 2010;26(11):2090-100.
35. Newgard CB, An J, Bain JR, Muehlbauer MJ, Stevens RD, Lien LF et al. A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. Cell Metab. 2009;9(4):311-26.
36. Zhang X, Wang Y, Hao F, Zhou X, Han X, Tang H et al. Human serum metabonomic analysis reveals progression axes for glucose intolerance and insulin resistance statuses. J Proteome Res. 2009;8(11):5188-95.
37. Brindle JT, Antti H, Holmes E, Tranter G, Nicholson JK, Bethell HW et al. Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using 1H-NMR-based metabonomics. Nat Med. 2002;8(12):1439-44.
38. Andersen MB, Rinnan Å, Manach C, Poulsen SK, Pujos-Guillot E, Larsen TM et al. Untargeted metabolomics as a screening tool

for estimating compliance to a dietary pattern. J Proteome Res. 2014;13(3):1405-18.
39. Floegel A, Wientzek A, Bachlechner U, Jacobs S, Drogan D, Prehn C et al. Linking diet, physical activity, cardiorespiratory fitness and obesity to serum metabolite networks: findings from a population-based study. Int J Obes (Lond). 2014;38(11):1388-96.
40. Menni C, Zhai G, MacGregor A, Prehn C, Römisch-Margl W, Suhre K et al. Targeted metabolomics profiles are strongly correlated with nutritional patterns in women. Metabolomics. 2013;9(2):506-14.
41. Brennan L. Metabolomics in nutrition research: current status and perspectives. Biochem Soc Trans. 2013;41(2):670-3.
42. Llorach R, Garcia-Aloy M, Tulipani S, Vazquez-Fresno R, Andres-Lacueva C. Nutrimetabolomic strategies to develop new biomarkers of intake and health effects. J Agric Food Chem. 2012;60(36):8797-808.
43. Collino S, Martin FP, Kochhar S, Rezzi S. Nutritional metabonomics: an approach to promote personalized health and wellness. Chimia (Aarau). 2011;65(6):396-9.
44. Shriver BJ, Roman-Shriver CR, Long JD. Technology-based methods of dietary assessment: recent developments and considerations for clinical practice. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2010;13(5):548-51.
45. Thompson FE, Subar AF, Loria CM, Reedy JL, Baranowski T. Need for technological innovation in dietary assessment. J Am Diet Assoc. 2010;110(1):48-51.
46. Witschi J, Kowaloff H, Bloom S, Slack, W. Analysis of dietary data; an interactive computer method for storage and retrieval. J Am Diet Assoc. 1981;78:609-13.
47. Queiróz AR, Costa CA, Popolim WD, Lima SCTC, Philippi ST. Avaliação do consumo alimentar pela Internet por meio de inquérito de freqüência dietética simplificado. Nutrire: Rev Soc Bras Alim Nutr. 2007;32(1):11-22.
48. Ferrari P, Kaaks R, Fahey MT, Slimani N, Day NE, Pera G et al. Within- and between-cohort variation in measured macronutrient intakes, taking account of measurement errors, in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition study. Am J Epidemiol. 2004;160:814-22.
49. Ferrari P, Roddam A, Fahey MT, Jenab M, Bamia C, Ocké M et al. A bivariate measurement error model for nitrogen and potassium intakes to evaluate the performance of regression calibration in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition study. Eur J Clin Nutr. 2009 Supl 4;63:S179-87.
50. Slimani N, Deharveng G, Charrondière RU, van Kappel AL, Ocké MC, Welch A et al. Structure of the standardized computerized 24-h diet recall interview used as reference method in the 22 centers participating in the EPIC project. Comp Meth Prog Biomed. 1999;58(3):251-66.
51. Slimani N, Ferrari P, Ocké M, Welch A, Boeing H, Liere M et al. Standardization of the 24-h diet recall calibration method used in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): general concepts and preliminary results. Eur J Clin Nutr. 2000;54(12):900-17.
52. Slimani N, Bingham S, Runswick S, Ferrari P, Day NE, Welch AA et al. Group level validation of protein intakes estimated by 24-h diet recall and dietary questionnaires against 24-h urinary nitrogen in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) calibration study. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2003;12:784-95.
53. Slimani N, Casagrande C, Nicolas G, Freisling H, Huybrechts I, Ocké MC et al. The standardized computerized 24-h dietary recall method EPIC-Soft adapted for pan-European dietary monitoring. Eur J Clin Nutr. 2011 Supl 1;65:S5-15.
54. Brussaard JH, Johansson L, Kearney J, EFCOSUM Participants. Rationale and methods of the EFCOSUM project. Eur J Clin Nutr. 2002 Supl 2;56:S4-7.
55. Huybrechts I, Sioen I, Boon PE, Ruprich J, Lafay L, Turrini A, et al. Dietary exposure assessments for children in Europe (the EXPOCHI project): rationale, methods and design. Arch Public Health. 2011;69(1):4.
56. Raper N, Perloff B, Ingwersen L, Steinfeldt L, Anand J. An overview of USDA's dietary intake data system. J Food Compost Anal. 2004;17:545-55.
57. Verly Jr E, Cesar CL, Fisberg RM, Marchioni DM. Socio-economic variables influence the prevalence of inadequate nutrient intake in Brazilian adolescents: results from a population-based survey. Public Health Nutr. 2011;14(9):1533-8.
58. Conway JM, Ingwersen LA, Moshfegh AJ. Accuracy of dietary recall using the USDA five-step multiple-pass method in men: an observational validation study. J Am Diet Assoc. 2004;104(4):595-603.
59. Subar AF, Thompson FE, Potischman N, Forsyth BH, Buday R, Richards D et al. Formative research of a quick list for an automated self-administered 24-hour dietary recall. J Am Diet Assoc. 2007;107(6):1002-07.
60. Yon BA, Johnson RK, Harvey-Berino J, Gold BC. The use of a personal digital assistant for dietary self-monitoring does not improve the validity of self-reports of energy intake. J Am Diet Assoc. 2006;106(8):1256-9.
61. Beasley J, Riley WT, Jean-Mary J. Accuracy of a PDA-based dietary assesnt program. Nutr. 2005;21(6):672-7.
62. Penn L, Boeing H, Boushey CJ, Dragsted LO, Kaput J, Scalbert A et al. Assessment of dietary intake: NuGO symposium report. Genes Nutr. 2010;5(3):205-13.
63. Cade J, Thompson R, Burley V, Warm D. Development, validation and utilisation of food-frequency questionnaires – a review. Public Health Nutr. 2001;5(4):567-87.
64. Beaton GH. Approaches to analysis of dietary data: relationship between planned analyses and choice of methodology. Am J Clin Nutr. 1994 Supl 1;59:253S-61S.
65. Marchioni DM, Latorre Mdo R, Eluf-Neto J, Wünsch-Filho V, Fisberg RM. Identification of dietary patterns using factor analysis in an epidemiological study in São Paulo. Sao Paulo Med J. 2005;123(3):124-7.
66. Slattery ML, Edwards SL, Caan B. Low-energy reporters: evaluation of potential differential reporting in case-control studies. Nutr Cancer. 2002;42(2):173-9.
67. Pryer JA, Vrijheid M, Nichols R, Kiggins M, Elliott P. Who are the 'low energy reporters' in the dietary and nutritional survey of British adults? Int J Epidemiol. 1997;26(1):146-54.
68. Beaton GH, Milner J, Corey P, McGuire V, Cousins M, Stewart E et al. Sources of variance in 24-hour dietary recall data: implications for nutrition study design and interpretation. Am J Clin Nutr. 1979;32(12):2546-59.
69. Wrieden WL, Momen NC. Workshop 3: Novel approaches for estimating portion sizes. Eur J Clin Nutr. 2009 Supl 1;63:80-1.
70. Lopes RPS, Botelho RBA. Álbum fotográfico de porções alimentares. São Paulo: Metha; 2008.
71. Fisberg RM, Villar BS. Manual de receitas e medidas caseiras para cálculo de inquéritos alimentares. São Paulo: Signus; 2002.

72. Pinheiro ABV, Neves PA, Lacerda EMA, Benzecry EH, Gomes MCS, Costa VM. Tabela para avaliação de consumo alimentar em medidas caseiras. São Paulo: Atheneu; 2002.
73. Zabotto CB, Vianna RPT, Gil MF. Registro fotográfico para inquéritos dietéticos – utensílios e porções. Campinas: RTN; 1996.
74. Cai H, Yang G, Xiang YB, Herbert JR, Liu DK, Zheng W et al. Source of variation among men in Shangahai, China. Pub Health Nut. 2005;8(8):1293-9.
75. Jahns L, Carriquiry A, Arab L, Mroz TA, Popkin BM. Within and between-person variation in nutrient intakes of Russian and U.S. children differs by sex and age. J Nutr. 2004;134(11):3114-20.
76. Harttig U, Haubrock J, Knüppel S, Boeing H; EFCOVAL Consortium. The MSM program: web-based statistics package for estimating usual dietary intake using the Multiple Source Method. Eur J Clin Nutr. 2011;65 Suppl 1:S87-91.
77. Haubrock J, Nöthlings U, Volatier JL, Dekkers A, Ocké M, Harttig U et al. Estimating usual food intake distributions by using the multiple source method in the EPIC-Potsdam Calibration Study. J Nutr. 2011;141(5):914-20.
78. Tooze JA, Midthune D, Dodd KW, Freedman LS, Krebs-Smith SM, Subar AF et al. A new statistical method for estimating the usual intake of episodically consumed foods with application to their distribution. J Am Diet Assoc. 2006;106(10):1575-87.
79. Carriquiry AL. Assessing the prevalence of nutrient inadequacy. Public Health Nutr. 1999;2(1):23-33.
80. Qi Q, Chu AY, Kang JH, Huang J, Rose LM, Jensen MK et al. Fried food consumption, genetic risk, and body mass index: gene-diet interaction analysis in three US cohort studies. BMJ 2014;348:g1610.
81. Qi Q, Chu AY, Kang JH, Jensen MK, Curhan GC, Pasquale LR et al. Sugar-sweetened beverages and genetic risk of obesity. N Engl J Med. 2012;367:1387-96.
82. Qi Q, Durst R, Schwarzfuchs D, Leitersdorf E, Shpitzen S, Li Y et al. CETP genotype and changes in lipid levels in response to weight-loss diet intervention: gene-diet interaction analysis in the POUNDS LOST and DIRECT randomized trials. J Lipid Res. 2014 in press
83. Moleres A, Campión J, Milagro FI, Marcos A, Campoy C, Garagorri JM et al. Differential DNA methylation patterns between high and low responders to a weight loss intervention in overweight or obese adolescents: the EVASYON study. FASEB J. 2013;27:2504-12.
84. Huang T, Tucker KL, Lee YC, Crott JW, Parnell LD, Shen J et al. Methylenetetrahydrofolate reductase variants associated with hypertension and cardiovascular disease interact with dietary polyunsaturated fatty acids to modulate plasma homocysteine in puerto rican adults. J Nutr. 2011;141(4):654-9.
85. Dumont J, Huybrechts I, Spinneker A, Gottrand F, Grammatikaki E, Bevilacqua N et al. FADS1 genetic variability interacts with dietary alfa-linolenic acid intake to affect serum non-HDL-cholesterol concentrations in European adolescents. J Nutr. 2011;141(7):1247-53.
86. Chu AY, Workalemahu T, Paynter NP, Rose LM, Giulianini F, Tanaka T et al. Novel locus including FGF21 is associated with dietary macronutrient intake. Hum. Mol. Genet. 2013;22:1895-902.
87. Ortega-Azorín C, Sorlí JV, Asensio EM, Coltell O, Martínez-González MÁ, Salas-Salvadó J et al. Associations of the FTO rs9939609 and the MC4R rs17782313 polymorphisms with type 2 diabetes are modulated by diet, being higher when adherence to the Mediterranean diet pattern is low. Cardiovasc Diabetol. 2012;11:137.
88. Yap RW, Shidoji Y, Hon WM, Masaki M. Association and interaction between dietary pattern and VEGF receptor-2 (VEGFR2) gene polymorphisms on blood lipids in Chinese Malaysian and Japanese adults. Asia Pac J Clin Nutr. 2012;21(2):302-11.
89. Fiorito G, Guarrera S, Valle C, Ricceri F, Russo A, Grioni S et al. B-vitamins intake, DNA-methylation of One Carbon Metabolism and homocysteine pathway genes and myocardial infarction risk: the EPICOR study. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2014;24(5):483-8.
90. World Health Organization – WHO. Global action plan for the prevention and control of noncommunicable disease 2013-2020 [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2013 [cited 2014 Feb 20]. Available from:http://www.who.int/nmh/events/ncd_action_plan/en/
91. World Health Organization – WHO. Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva: World Health Organization; 2011. p. 176.
92. Schmidt MI, Duncan BB, Silva GA, Menezes AM, Monteiro CA, Barreto SM et al. Chronic noncommunicable diseases in Brazil: burden and current challenges. Lancet. 2011;377(9781):1949-61.

Polimorfismos avaliados em testes de nutrigenética disponíveis no mercado nacional e sua utilização na prática clínica

37

Maria Aderuza Horst

INTRODUÇÃO

Um marco para as ciências da saúde foi, sem dúvida, o sequenciamento completo do genoma humano. Embora as promessas sobre a descoberta da origem e da cura de doenças complexas não tenham se concretizado ao término do Projeto Genoma Humano (PGH), os avanços científicos e tecnológicos obtidos desde o seu lançamento oficial são inegáveis. Testes genéticos já eram utilizados na medicina tradicional, antes mesmo da conclusão do PGH, com o intuito de confirmar uma suspeita de diagnóstico, na triagem de doenças hereditárias em indivíduos com história familiar e no diagnóstico pré-implantacional. A maioria desses testes avalia doenças autossômicas relacionadas a um único gene, nas quais mutações caracterizam alta probabilidade (100% de chances) de desenvolvimento da doença. Um exemplo é a doença de Huntington, que é ocasionada por uma expansão da repetição dos trinucleotídios CAG (citosina-adenina-guanina) localizada na região 5' do gene *IT15* no braço curto do cromossomo 4.[1]

Entretanto, os testes de nutrigenética se enquadram em outra categoria de testes genéticos, a dos chamados testes preditivos, que podem ser utilizados com uma abordagem de medicina de precisão ou 4P genômica – personalizada, preditiva, participativa e preventiva.

A partir de 2005, a variedade de testes genéticos foi expandida. Há testes que envolvem análises complexas de amplo número de genes e se propõem, por exemplo, a identificar riscos para doenças crônicas, como as cardiovasculares e o câncer, ou para quantificar o risco de recorrência de câncer de um paciente. Há também muitos testes para prever a eficácia da terapêutica e orientar sua administração e dosagem. Além disso, há possibilidade de sequenciamento do exoma (análise apenas da região codificadora do genoma) e de sequenciamento do genoma completo.

As expectativas em torno das vantagens que o sequenciamento completo do genoma humano poderia ocasionar estimularam empresas de tecnologia genômica a competirem na chamada "Corrida pelo Genoma de mil dólares". Esses valores foram anunciados pela primeira vez em 2012 e, com o passar do tempo, surgem mais tecnologias que prometem a realização do sequenciamento com menor custo, maior rapidez e qualidade. Entretanto, a redução do preço do sequenciamento não teve as repercussões esperadas, pois logo ficou claro que o maior desafio não é apenas sequenciar o genoma humano, mas interpretar as informações codificadas em aproximadamente três bilhões de pares de nucleotídeos.

Nesse sentido, muitas pesquisas são conduzidas a fim de aumentar a compreensão sobre as informações acerca do genoma humano. Um exemplo é o Projeto Internacional Mil Genomas, que revelou que o genoma humano apresenta 38 milhões de possibilidades de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) e 1,4 milhão de inserções e deleções.[2] Além disso, outro projeto internacional, o HapMap, busca determinar padrões de variação genética, e já determinou um extenso número de haplótipos ou combinações de SNP que ocorrem simultaneamente em indivíduos de determinados grupos populacionais. Um mapa dessas variações genéticas pode ser utilizado para prever os padrões que determinam uma doença ou as respostas aos tratamentos.[3] Outra abordagem diz respeito aos estudos de associação ampla do genoma (GWAS), que permitem que pesquisadores associem um catálogo com um amplo número de variantes genéticas com centenas de doenças comuns e alterações metabólicas. Dessa forma, é possível estimar quais variações são específicas de determinada condição clínica e, ainda, direcionar tratamentos e abordagens específicas.[4]

Os avanços na compreensão das implicações de variações genéticas sobre o fenótipo permitiram a expansão

de uma nova área de negócios, a dos testes genéticos preditivos comercializados diretamente para o consumidor (DTC, *direct-to-consumer*), mais populares nos Estados Unidos. Dentre as principais empresas que comercializam os testes DTC destacam-se a 23andMe, a Navigenics, a Atlas Sports Genetics, a deCODE Genetics, a DNA Direct, a DNA Plus e a Genelex Corporation. Estima-se que esse mercado fature aproximadamente 233,7 milhões de dólares até 2018.[5]

Os testes genéticos preditivos, incluindo aqueles de nutrigenética, ganharam força no Brasil a partir de 2012 e, desde então, surgem cada vez mais empresas que oferecem serviços de genotipagem com diferentes abordagens e polimorfismos distintos em seus testes. Assim, a possibilidade da realização de testes genéticos aumentou e, nesse cenário, é fundamental que nutricionistas estejam aptos a compreender, interpretar e utilizar tais testes de maneira adequada.

TESTES DE NUTRIGENÉTICA NO BRASIL

A prescrição nutricional deve ter como principal objetivo a promoção da saúde e da qualidade de vida. O enfoque mais importante dos testes genéticos relacionados à nutrição é a análise de variações genéticas, principalmente SNP, que possam predizer as necessidades nutricionais individuais, a fim de direcionar intervenções para reduzir o risco do surgimento de doenças crônicas não transmissíveis. Com relação à alimentação ideal, a expressão "um tamanho não serve para todos" (*one size does not fit all)* tem sido, ao longo dos últimos anos, aplicada em estudos sobre interações entre genes e alimentação. Assim, a nutrigenética pode ser uma ferramenta para auxiliar a atingir as quantidades ideais de nutrientes em uma abordagem individual e personalizada.[6]

Testes de nutrigenética analisam genes envolvidos principalmente com a obesidade, com o metabolismo e transporte de nutrientes e com enzimas de destoxificação e antioxidantes. De acordo com as variações genéticas de um indivíduo, um aconselhamento nutricional personalizado pode ser elaborado com recomendações e sugestões nutricionais e de estilo de vida para atingir metas específicas, como a perda de peso ou o controle da glicemia e da colesterolemia.

Sabe-se que, sob a mesma intervenção nutricional, cada indivíduo poderá exibir respostas biológicas distintas. Nesse sentido, um dos desafios mais intrigantes da nutrição é definir qual padrão alimentar melhor se adapta às necessidades de nutrientes, as quais, por sua vez, são influenciadas pelo genótipo. Assim, testes de nutrigenética podem ser aliados no auxílio da prescrição nutricional individualizada e, quando houver tal possibilidade, devem ser utilizados de maneira a complementar o atendimento nutricional, não substituindo nenhuma ferramenta clássica de avaliação. Os testes de nutrigenética isoladamente não são suficientes para a personalização da alimentação, nem tampouco para a prescrição de suplementos. Contudo, há evidências contundentes para a utilização de algumas variações genéticas como base para a prescrição nutricional, após avaliações nutricional, antropométrica e clínica criteriosas e, ainda, com o auxílio de exames bioquímicos.

No Brasil, até o ano de 2015, havia um teste nacional e cinco testes de empresas estrangeiras comercializados por laboratórios nacionais que podem ser prescritos por nutricionistas. Todavia, em termos legais, por se tratar de testes preditivos, não há necessidade de prescrição e, apesar de não recomendado, o próprio consumidor pode solicitar o seu exame de nutrigenética. As principais diferenças entre os testes estão na forma de coleta do material utilizado para extração do DNA, na abordagem dos resultados nos laudos e no número de polimorfismos avaliados.

Com relação à coleta do material genético a ser avaliado, em todos os testes comercializados no Brasil ela é do tipo não invasiva de células bucais, realizada com o auxílio de um *swab* ou diretamente da saliva (Figura 37.1). A coleta pode ser realizada pelo próprio indivíduo, com o auxílio de *kits* comerciais próprios para essa finalidade e que contêm solução tampão para preservação do DNA genômico. É necessário que o paciente esteja em jejum por pelo menos uma hora.

Figura 37.1 Ilustração das formas de coleta não invasivas de material genético para testes de nutrigenética.

A abordagem dos resultados nos laudos é realizada de quatro formas distintas:

- Apenas relatando o resultado do polimorfismo avaliado, sem interpretação.
- Por meio da associação com condições metabólicas ou risco do desenvolvimento de doenças, como obesidade, diabete, dislipidemias, predisposição a comportamentos alimentares e, ainda, quais nutrientes e alimentos devem ser priorizados de acordo com variações específicas no DNA avaliado.

- Com a sugestão de padrões de planos alimentares preestabelecidos, sugerindo, por exemplo, a exclusão de determinados alimentos ou o número de calorias que devem ser ingeridas.
- Relacionando variações genéticas com o consumo de alimentos ou nutrientes específicos, sem mencionar o risco de doenças e condições metabólicas.

Alguns testes mesclam as abordagens descritas anteriormente. Por exemplo, há um teste que aborda o risco do desenvolvimento de doença celíaca e também sugere um padrão alimentar preestabelecido, e outro que associa principalmente o consumo de nutrientes e alimentos com variações genéticas, mas também descreve o risco do desenvolvimento de diabete melito tipo 2. Há ainda dois testes de nutrigenética que incluem variações genéticas relativas à aptidão para exercícios físicos.

O número de polimorfismos avaliados em cada teste disponível no Brasil varia de 11 até mais de 100. Tomando-se como exemplo apenas a predisposição para a obesidade, ainda há diferenças na quantidade de variações analisadas entre os testes. Há possibilidades de 3, 5, 12, 17, 24, ou o teste pode não fazer tal abordagem. Alguns testes podem ainda ser comercializados como um "combo" ou na forma de condições específicas, como apenas para a avaliação das variações genéticas que determinam a não persistência da lactase ou apenas o risco do desenvolvimento de obesidade.

UTILIZAÇÃO NA PRÁTICA CLÍNICA

Na prática clínica, o nutricionista que optar pela prescrição de testes de nutrigenética como auxiliares na prescrição nutricional deve utilizar e integrar os conhecimentos das subdisciplinas da genômica nutricional. Resumidamente, a nutrigenética refere-se à influência de variações no DNA nas respostas aos nutrientes, ao passo que a nutrigenômica diz respeito ao papel de nutrientes e compostos bioativos de alimentos (CBA) na expressão gênica. A epigenômica nutricional abrange o estudo de como os nutrientes e CBA modulam a expressão gênica por influenciar eventos epigenéticos.[7] Os testes de nutrigenética baseiam-se no princípio de que existem diferenças individuais na resposta a exposições agudas ou repetidas a determinado nutriente, CBA ou combinações destes.

Ao longo do tempo, a alimentação influenciou o padrão de expressão gênica, resultando em fenótipos que são capazes de responder com êxito aos desafios ambientais e que permitem a melhor adaptação aos recursos nutricionais disponíveis. Essas adaptações têm sido fundamentais para o crescimento e desenvolvimento humano, e os avanços tecnológicos tornaram possível investigar não apenas os genes e suas variações, mas também explorar o epigenoma, os transcritos, as proteínas e metabólitos e as modificações ocasionadas pela alimentação. Essas análises proporcionam a oportunidade para estabelecer as bases para a incorporação da individualidade biológica em recomendações nutricionais, com potencial terapêutico significativo.[8]

Em experiência clínica prática, Arkadianos et al.[9] avaliaram cinquenta pacientes que realizaram um teste de nutrigenética e um grupo de 43 pacientes (pareados por idade, sexo e frequência de consultas) que receberam a dieta padrão para perda de peso. As orientações personalizadas foram direcionadas de acordo com o perfil genético de cada paciente para 24 polimorfismos (em genes envolvidos no metabolismo de macronutrientes, de vitaminas do complexo B, de vitamina D, de enzimas antioxidantes, de destoxificação e de resposta inflamatória). As observações nos primeiros três meses de intervenção indicaram que os pacientes de ambos os grupos apresentaram redução de peso de maneira semelhante. Entretanto, após um ano de intervenção, os pacientes que receberam a prescrição nutricional de acordo com o perfil genético continuaram a perder peso, enquanto os que receberam a prescrição tradicional voltaram a ganhar peso. Além disso, o resultado mais significativo entre os dois grupos foi com relação à glicemia de jejum: apenas o grupo que recebeu as orientações personalizadas pelo genótipo apresentou melhora significativa.

Outro trabalho com o objetivo de comparar os resultados de orientações nutricionais padrão e personalizadas a partir do genótipo direcionou a dieta de acordo com o resultado de sete SNP [*APOA2* (rs5082), *ADIPOQ* (rs17300539), *FTO* (rs9939609), *KCTD10* (rs10850219), *LIPC* (rs1800588), *MMAB* (rs2241201) e *PPARG* (rs1801282)]. Foram avaliados trinta indivíduos no grupo que realizou o teste de nutrigenética e 21 no grupo controle, todos com índice de massa corporal (IMC) acima de 30 kg/m^2. As orientações nutricionais foram padronizadas entre os grupos. O grupo do teste de nutrigenética seguiu uma das quatro possibilidades de dieta com diferentes porcentagens de carboidratos, lipídios e proteínas, respectivamente: balanceada (55%, 25% e 20%); hipoglicídica (40%, 30% e 30%); hipolipídica (55-60%, 20% e 20-25%) ou mediterrânea (45%, 35% e 20%). Todos os indivíduos do grupo controle receberam a dieta balanceada. Não houve diferença significativa entre os grupos quanto ao percentual de participantes que apresentou redução de 5% do seu peso corporal após 8 ou 24 semanas de intervenção. Ambos os grupos tiveram dificuldade em aderir às dietas; no entanto, a adesão foi maior no grupo que realizou o teste de nutrigenética, e houve correlação com a perda de

peso, o que não ocorreu no grupo controle. Os indivíduos que tinham genótipo de baixo risco para a obesidade apresentaram maior redução de peso e da circunferência da cintura em comparação aos que carreavam o genótipo de alto risco.[10.]

Doenças complexas como as cardiovasculares, o diabete e o câncer são consequência da interação entre fatores ambientais e genéticos, sendo as variações genéticas apenas preditoras do risco. Por causa do amplo número de interações possíveis, a associação entre genes, doenças e ambiente ainda não é completamente compreendida, o que limita o valor diagnóstico dos testes de nutrigenética.

Com relação à prescrição e utilização de testes de nutrigenética por nutricionistas, cabe destacar que até agosto de 2016, apenas o conselho regional de nutrição 3 (CRN3) se manifestou, e finalizou o seu parecer com as seguintes exposições:

- Testes de nutrigenética são preditivos e não diagnósticos, não devem substituir outros exames e avaliações necessários ao tratamento e devem ser utilizados apenas como ferramenta adicional à prescrição nutricional.
- O nutricionista deve pautar sua atuação no Código de Ética, estar capacitado a interpretar os testes de nutrigenética e a orientar adequadamente seus clientes.
- É extremamente importante ressaltar que a interpretação equivocada dos testes de nutrigenética pode causar prejuízos ao paciente.
- A recomendação de suplementos baseada em testes de nutrigenética não possui evidências científicas suficientes até o momento, devendo o nutricionista enfatizar ao paciente a importância do consumo dos alimentos.
- Os nutricionistas deverão estar capacitados/especializados para solicitar e interpretar corretamente tais testes, bem como para aplicá-los da forma mais adequada e racional em sua rotina de atendimento.

A aplicação prática de testes de nutrigenética tem como base o conhecimento de um potencial risco de um indivíduo desenvolver doenças e a possibilidade de intervenções nutricionais que possam mitigar esse risco ou aumentar as chances de sucesso de tratamentos. O atendimento nutricional com base em testes de nutrigenética deve incluir todas as etapas do atendimento nutricional convencional, com levantamento do histórico familiar, parâmetros bioquímicos, avaliação nutricional e antropométrica, investigação de fatores de risco para doenças crônicas não transmissíveis e demais aspectos que o profissional considerar necessários.

A decisão sobre a realização do teste de nutrigenética deve ser tomada pelo paciente. Cabe ao profissional informar todos os riscos, benefícios e limitações, bem como dirimir dúvidas. Após as orientações, a interpretação dos resultados de um teste de nutrigenética deve ser criteriosa e a transmissão dos resultados para os pacientes deve ser realizada por profissionais capacitados e com conhecimentos suficientes de genômica nutricional, uma vez que tais resultados podem fornecer informações sobre o risco individual de desenvolver doenças que não têm cura, como a doença de Alzheimer. Tais resultados devem ser explicados com cautela, para não alarmar de forma incorreta os pacientes. Nesse sentido, é importante destacar que estudos revelaram grandes lacunas no conhecimento e nas habilidades dos profissionais da área da saúde, inclusive nutricionistas, em países desenvolvidos como Reino Unido e Canadá.[11,12]

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Impulsionado pela publicação dos resultados do sequenciamento do genoma humano, o estudo de aspectos de genômica nutricional pode auxiliar na avaliação da predisposição ou da resposta de um indivíduo a um estímulo ou desafio ambiental, como a alimentação. Análises transcriptômicas, proteômicas, metabolômicas e epigenéticas podem proporcionar visões holísticas de condições biológicas com o intuito de direcionar prescrições nutricionais personalizadas a partir do genótipo. Entretanto, ainda há muito a ser desvendado pela ciência.

Apesar de os estudos com intervenções nutricionais personalizadas com base na utilização de testes de nutrigenética mostrarem resultados promissores, eles foram realizados com número pequeno de indivíduos e a ancestralidade não foi considerada. Além disso, o custo de um teste de nutrigenética parece ser um dos principais empecilhos para a ampliação da sua utilização. Com a redução dos custos do sequenciamento do genoma, a possibilidade da obtenção da informação genética não será mais limitante. Em vez disso, a capacidade de analisar tais dados e a aplicação prática é que será o principal obstáculo a ser superado.[4] Para que se obtenha melhor capacitação de nutricionistas para a interpretação dos testes de nutrigenética, existe a necessidade da incorporação de disciplinas como biologia molecular e genômica nutricional na grade curricular dos cursos de graduação em nutrição. A genômica nutricional é uma ciência em ascensão e estudos cada vez mais amplos e complexos precisam ser conduzidos com o objetivo de determinar recomendações nutricionais baseadas no genótipo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Shannon KM, Fraint A. Therapeutic advances in Huntington's Disease. Mov Disord. 2015;30(11):1539-46.

2. 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. Nature. 2012; 491(7422):56-65.
3. International Hapmap Consortium. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. Nature. 2007;449: 851-61.
4. Salari K, Watkins H, Ashley EA. Personalized medicine: hope or hype? Eur Heart J. 2012;33(13):1564-70.
5. Global Industry Analysts. Future of direct-to-consumer (DTC) genetic testing market remains fraught with challenges. Disponível em http://www.prweb.com/releases/DTC_genetic_testing/direct_to_consumer_tests/prweb9780295.htm. Acesso em 29 set 2015.
6. Ordovas JM. Genetic interactions with diet influence the risk of cardiovascular disease. Am J Clin Nutr. 2006;83(2):443S-446S.
7. Camp KM, Trujillo E. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: nutritional genomics. J Acad Nutr Diet. 2014;114(2):299-312.
8. Bouchard C, Ordovas JM. Fundamentals of nutrigenetics and nutrigenomics. Prog Mol Biol Transl Sci. 2012;108:1-15.
9. Arkadianos I, Valdes AM, Marinos E, Florou A, Gill RD, Grimaldi KA.Improved weight management using genetic information to personalize a calorie controlled diet. Nutr J. 2007;6:29.
10. Frankwich KA, Egnatios J, Kenyon ML, Rutledge TR, Liao PS, Gupta S et al. Differences in weight loss between persons on standard balanced vs nutrigenetic diets in a randomized controlled trial. Clin Gastroenterol Hepatol. 2015;13(9):1625-32.e1.
11. Weir M, Morin K, Ries N, Castle D. Canadian health care professionals' knowledge, attitudes and perceptions of nutritional genomics. Br J Nutr. 2010;104(8):1112-9.
12. Whelan K, McCarthy S, Pufulete M. Genetics and diet-gene interactions: involvement, confidence and knowledge of dietitians. Br J Nutr. 2008;99(1):23-28.
national survey of knowledge, involvement and confidence among dietitians in the US, Australia and the UK. Genes Nutr. 2013;8(6):523-33.

38 Bioética e testes (nutri)genéticos preditivos

Carla Cristina de Morais
Cristiane Cominetti

INTRODUÇÃO

O termo bioética pode ser definido de diversas maneiras, desde abordagens gerais, como “ética da vida”, até definições mais específicas, como “conjunto de conceitos, argumentos e normas que valorizam e legitimam eticamente os atos humanos, cujos efeitos afetam profunda e irreversivelmente, de maneira real ou potencial, os sistemas vivos”. Ou, ainda, o “estudo sistemático das dimensões morais das ciências da vida e saúde, utilizando uma variedade de metodologias éticas num contexto interdisciplinar”. Apresenta-se como a busca de um comportamento responsável ao decidir tipos de tratamento, pesquisas e posturas perante a sociedade. Esses e outros conceitos estão constantemente em evolução e englobam elementos comuns entre eles: o valor à vida e à moral.[1]

Todavia, a bioética não é a ciência do julgamento moral ou uma verdade concreta e absoluta. Para alcançar seus verdadeiros fundamentos, é necessária uma abordagem multidisciplinar, que perpasse as áreas médicas, biológicas, filosóficas, e também o direito, a antropologia, a ciência política, a teologia e a economia. Ela se distingue entre bioética de situações persistentes, que trata de assuntos relacionados à vida humana e que perduram desde os tempos antigos, como racismo, discriminação e exclusão social; e bioética de situações emergentes, marcada pelos conflitos de origem recente, como reprodução assistida, doações e transplantes de órgãos, mapeamentos genéticos e outros temas atuais.[2]

O uso de testes genéticos preditivos no Brasil, isto é, aqueles realizados em indivíduos assintomáticos para verificar o risco de desenvolver determinadas doenças, tem aumentado. Nesse contexto, é importante diferenciar as doenças monogênicas com alta penetrância, em que o indivíduo carreador da variação genética apresenta alto risco de desenvolver a condição, e as doenças poligênicas e multifatoriais, em que o carreador das variações pode ter risco aumentado se comparado à população em geral, mas tal risco depende, também, de fatores ambientais que podem ser manipulados.[3] O segundo grupo abrange as doenças crônicas não transmissíveis em que o padrão alimentar é um fator ambiental relevante. Nessa área, os testes de nutrigenética emergem como uma possibilidade de aperfeiçoar o cuidado nutricional individual em conjunto com dados clínicos, bioquímicos e familiares.[4]

Uma conduta nutricional ética deve atender às necessidades psicofísicas, socioeconômicas e culturais de forma equilibrada, além de ser capaz de valorizar e preservar o potencial do meio ambiente e do paciente. Deve, ainda, sempre considerar cada indivíduo de maneira holística, sob os aspectos biopsicossociais, de modo a respeitar a individualidade inerente ao ser humano.[5] Nesse sentido, os testes de nutrigenética vêm ao encontro do cuidado personalizado, que compreende cada paciente em sua singularidade sob os aspectos biológicos, ambientais e psicossociais e genéticos.

TESTES GENÉTICOS PREDITIVOS: ASPECTOS BIOÉTICOS

A Associação Médica Brasileira e o Conselho Federal de Medicina[3] destacam a seguinte recomendação geral:

> A possibilidade da realização dos testes preditivos para doenças genéticas influencia diferentes aspectos da saúde, com consequências psicossociais, éticas e profissionais muito específicas e complexas. Recomenda-se que o atendimento seja adequado às famílias que procuram o serviço de genética e procure enfocar suas necessidades específicas.

O maior pressuposto para a realização de um teste preditivo é a existência de um protocolo organizado e estruturado para aconselhamento, avaliação e acompanhamento biopsicossocial antes da realização e após o recebimento do resultado, conduzido por profissionais capacitados. Ainda que o interesse seja totalmente voluntário e espontâneo, o paciente deve passar por avaliação psicológica antes do exame. Além disso, a equipe multiprofissional deve prezar pela qualidade de vida do ser humano que se submeteu a tal teste. Todo resultado, ainda que desfavorável e com opções terapêuticas limitadas, deve ser avaliado cautelosamente e o paciente deve ser orientado com vistas à promoção da saúde.[3]

A responsabilidade do profissional no cuidado à saúde deve ser pautada em uma visão bioética, com caráter crítico e reflexivo para cada conduta. Apesar dos avanços nos conhecimentos sobre genética humana, ainda há muito o que se discutir sobre os aspectos bioéticos e psicossociais do uso do material genético.[6] O Projeto Genoma Humano, marco no estudo na genética humana, estimulou a discussão mundial do uso do material genético sob os aspectos éticos, legais e psicossociais.[7] Entretanto, conforme Van Renselaer Potter já ressaltava em 1971, o conhecimento avança a passos mais largos que a sabedoria para utilizá-lo.[6]

Um aspecto a ser respeitado é a obrigatoriedade do sigilo das informações resultantes dos testes genéticos, o que vai ao encontro da preservação da dignidade, da autonomia e da liberdade do paciente. Além disso, o sigilo acerca dos resultados evita a possibilidade de discriminação de qualquer âmbito, seja de planos de saúde, seguros de vida, seleções para vagas de emprego e outras circunstâncias que possam prejudicar o indivíduo. O Projeto de Lei n. 4.610, de 1998, e as proposições apensadas (Projetos de Lei n. 1.934, de 1999; n. 4.900, de 1999; n. 3.377, de 2000; n. 4.661, de 2001; n. 4.662, de 2001; e n. 7.373, de 2006) versam acerca da proteção contra a discriminação da pessoa em razão da informação genética.

Em relação aos testes de nutrigenética, apesar de seu objetivo ser a determinação de um genótipo de risco ou de proteção para doenças crônicas não transmissíveis segundo grupos de variações genéticas, a identificação de determinado polimorfismo genético utilizada no teste pode ser preditora de uma condição de saúde grave, a qual não é foco do exame. Um exemplo dessa situação é a avaliação de alterações no gene da apolipoproteína E (APOE) no que se refere ao risco de desenvolvimento de dislipidemias e doenças cardiovasculares em testes de nutrigenética. Além da relação desse gene com o risco aumentado para alterações no metabolismo de lipídios, a literatura científica também reconhece que ele está relacionado com maior risco para o desenvolvimento da doença de Alzheimer, ainda que a possível relação entre o colesterol e essa doença neurodegenerativa não esteja totalmente elucidada.[8] Nesse caso, pode-se questionar se o paciente deve ou não ser informado sobre o risco aumentado para tal doença, uma vez que a proposta inicial do exame não é essa. Por isso, recomenda-se o aconselhamento genético pré e pós-teste, para esclarecimento de tais aspectos, e que a decisão sobre receber a informação ou não sobre os riscos seja do paciente.

Outro aspecto que deve ser discutido é a linha tênue entre o direito à informação e o risco de ocorrência de eugenia (de etmologia grega: *eugéneia* significa "gerar o melhor", eu = bom/melhor, genia = gerar/geração). Por exemplo, os testes pré-natais podem ser interpretados como um direito dos pais de conhecer as condições genéticas dos futuros filhos ou uma possibilidade de discriminação segundo características de desempenho intelectual e aspectos físicos. A questão a ser respondida é: seria direito do ser humano conhecer o seu patrimônio genético de modo a evitar a proliferação de características desfavoráveis para a espécie? Exemplo claro refere-se às mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, que aumentam o risco para câncer de mama e ovário em mulheres, e a alteração no gene *HTT*, responsável pela doença de Huntington, em que há 50% de probabilidade de o filho desenvolver a doença caso um dos pais apresente essa mutação genética. Se os pais estiverem em idade reprodutiva, isso poderá auxiliar na decisão de ter ou não filhos. Entretanto, caso já tenham ultrapassado o período reprodutivo, não há benefício em conhecer tal característica.[6,9]

Situação semelhante ocorre no esporte, uma vez que testes genéticos com atletas podem auxiliar no direcionamento de treinos e modalidades nas quais o indivíduo tem maiores chances de apresentar melhor rendimento. Os resultados podem, também, ser utilizados para determinar qual atleta deve ou não ser contratado por um clube ou receber patrocínio. Entretanto, a principal questão nesse sentido é a de que apenas a predisposição genética não é suficiente para que o atleta atinja excelência no esporte; o treinamento adequado e outros fatores ambientais são imprescindíveis. Outro aspecto importante relacionado ao esporte é o *doping* genético, assunto que é pauta constante da Agência Internacional Antidoping (Wada, *World Anti-Doping Agency*), uma vez que os riscos para a saúde humana, como o uso de vetores contaminados para transferência de genes, são iminentes e, além disso, a detecção dessa prática é ainda limitada. Apesar disso, tais procedimentos têm sido realizados cada vez mais em atletas com o objetivo de melhorar o desempenho físico, desconsiderando os limites da bioética e burlando as normas das competições.[10]

Ao ampliar a discussão para o processo de saúde e doença, deve-se pensar no acesso da população aos testes genéticos preditivos. Apesar da redução nos custos, ainda são exames onerosos, aos quais pequena parcela da população tem acesso. Além disso, a confiabilidade e a interpretação dos testes devem ser sempre revistas, uma vez que a aplicação em larga escala deve garantir a segurança e não alarmar o paciente que se submete ao exame.

Nesse sentido, surgem alguns questionamentos: qual instância do governo deve regulamentar a realização dos testes genéticos preditivos? Até que ponto o governo deve instituir protocolos de orientação? Por exemplo, em se tratando de doenças para as quais ainda não há protocolo de tratamento, vale a pena descobrir o maior risco, apontado por testes preditivos com antecedência, de maneira a manipular os fatores de risco ambientais, ou isso acarretaria medo e apreensão ao paciente e seus familiares? Os interesses financeiros, éticos e de pesquisa devem ser regidos por qual força legal maior? Em relação aos testes de nutrigenética, que apontam fatores genéticos de risco aumentado ou proteção para determinadas situações de saúde relacionadas à alimentação e ao estilo de vida, deve-se manter a mesma postura em relação aos testes preditivos para doenças genéticas raras? Ou estes devem ser considerados exames complementares para ampliar a qualidade do cuidado nutricional individualizado de forma preventiva e, assim, com menor rigidez regulatória?

Diante de tantos questionamentos sob a luz da bioética, um consenso é a necessidade expressa de consentimento livre e esclarecido para a realização dos testes preditivos do paciente. Já ao tratar de indivíduos incapazes de decidir por receber ou não tais informações, como crianças e adolescentes, incapazes juridicamente, ou, ainda, em casos de testes pré-natais, a autorização deve ser do responsável legal.[9,11] Além disso, o armazenamento e a manipulação de amostras, ainda que para fins de pesquisa científica, sem autorização legal, constituem crime.[12]

A realização de testes em crianças e adolescentes assintomáticos deve ser evitada, a menos que a possibilidade de tratamento precoce e a redução das limitações geradas por doenças genéticas raras de desenvolvimento tardio já estejam bem instituídas no âmbito científico. Caso contrário, deve-se aguardar a maioridade para que o indivíduo responda por si. Já no âmbito da adoção legal, o perfil genético da criança ou adolescente pode ser interpretado sob dois ângulos. O conhecimento de um risco aumentado para uma condição de saúde pode auxiliar na escolha de pais aptos a acolher o indivíduo ou pode reduzir a possibilidade de adoção. Além disso, a história médica do indivíduo adotado pode ser, parcialmente, esclarecida pelo conhecimento do perfil genético.[11]

Desse modo, a formação de recursos humanos especializados é imprescindível para o aproveitamento do conhecimento acerca da genética humana no cuidado responsável à saúde. Para tanto, estudar e compreender a genômica nutricional e os testes genéticos associados permitirá que posicionamentos prudentes e amadurecidos das questões éticas suscitadas sejam estabelecidos.

TESTES DE NUTRIGENÉTICA: PERSPECTIVAS E LIMITES

Os testes de nutrigenética, também classificados como testes genéticos preditivos, baseiam-se no pressuposto de que o conhecimento do perfil genético facilitará a instituição de planos alimentares personalizados que, aliadas ao estilo de vida saudável, atuarão na promoção da saúde e na redução do risco de desenvolvimento de doenças ou de condições clínicas que afetam a saúde. Os resultados da maioria dos testes apontam fatores genéticos associados ao risco de doenças crônicas relacionadas à alimentação (dislipidemias, intolerâncias nutricionais, obesidade, diabete melito, hipertensão arterial, doenças cardiovasculares e outras situações metabólicas), de modo a amparar a conduta do nutricionista ou do médico responsável.[13,14]

Ainda que o conhecimento para uma intervenção de nutrição personalizada necessite ser aprofundado e mais bem explorado, o profissional pode e deve amparar-se em dados já estabelecidos do paciente, como a história familiar, os parâmetros bioquímicos e clínicos, bem como a presença de fatores de risco para determinada doença. O nutricionista e demais profissionais de saúde devem dominar o conhecimento técnico na área da genômica, com senso crítico, capacidade de divulgar as informações do teste preditivo de maneira imparcial e conscientizar-se do papel que representam como formadores de opinião junto à sociedade.[13,15]

O parecer técnico do Conselho Regional de Nutricionistas – 3ª Região (CRN3) quanto ao uso de testes de nutrigenética reforça a necessidade de bom senso e comprovações científicas na determinação da conduta do nutricionista. Destaca o caráter preditivo e não diagnóstico dos testes, os quais devem ser considerados ferramentas adicionais à prescrição nutricional individualizada, sendo imprescindível a aplicação de avaliações e a combinação de outros exames.[13] A conduta do profissional deve estar amparada no Código de Ética do Nutricionista,[16] e este deve ter capacidade de interpretar os testes de nutrigenética e orientar adequadamente seus pacientes. Vale destacar o risco de uma interpretação errônea de um teste genético, que pode desencadear prejuízos físicos e psicossociais ao paciente. Por fim, o CRN3 assume que ainda não há evidências científicas suficientes para respaldar a suplementação nutricional baseada em testes de nutrigenética.

O posicionamento da Academy of the Nutrition and Dietetics acerca da genômica nutricional alerta que os estudos com testes de nutrigenética para o aconselhamento nutricional personalizado devem ainda ser explorados para garantir o uso clínico seguro. Enfatiza, também, que as doenças e condições de saúde crônicas, como o diabete, a hipertensão arterial, as doenças cardiovasculares e as dislipidemias, apresentam etiologia multifatorial e multigênica. Desse modo, os testes de nutrigenética são parcialmente preditivos para o risco de desenvolver determinada doença. Reforça, ainda, que os profissionais de saúde devem ter formação científica suficiente na área de genômica nutricional para um aconselhamento genético responsável.[4]

O Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Office of Public Health Genomics estabeleceu o protocolo ACCE (*Analytic validity, Clinical validity, Clinical utility and associated Ethical, legal and social implications*) para a avaliação de testes genéticos quanto à validade analítica e clínica, a utilidade clínica, e as implicações éticas, jurídicas e sociais. Essa estratégia visa regulamentar as empresas que fornecem testes genéticos no ambiente clínico, com supervisão e aconselhamento do profissional de saúde, e também no ambiente virtual, em que os testes têm sido disseminados a passos largos em virtude do custo acessível, mas sem orientação direcionada ao paciente.[4,17]

A regulamentação dos testes genéticos a partir do governo pode incluir a proibição de testes com venda direta para os pacientes; a autorização da publicidade e venda somente para os testes com menor risco; a regulamentação e fiscalização de empresas e laboratórios; e, ainda, a educação em saúde junto à população. Entretanto, a legislação brasileira quanto à regulamentação e fiscalização das empresas que fornecem testes de nutrigenética ainda é inexistente. Espera-se, contudo, que a prescrição de testes de nutrigenética seja preferencialmente feita por nutricionistas e/ou por médicos capacitados que forneçam aconselhamento genômico nutricional. Todavia, a maioria dos profissionais de saúde não tem formação básica em genética clínica.

Com relação aos testes vendidos diretamente ao consumidor por meio da internet, acredita-se que os riscos sobreponham os benefícios das informações adquiridas pelos pacientes, uma vez que não há aconselhamento individualizado por um profissional especializado. Se, em muitas situações, os profissionais de saúde não estão aptos a interpretar os testes genéticos preditivos e a orientar corretamente o paciente, há grande risco de o indivíduo leigo alarmar-se com algum resultado mal interpretado, o que pode ocasionar danos biopsicossociais. O indivíduo pode assustar-se com os resultados sem a correta orientação ou, ainda, automedicar-se e optar por tratamentos considerados personalizados, normalmente onerosos e sem comprovação científica de eficácia.[18]

Outro fator que dificulta a disseminação dos testes genéticos no meio biomédico é a adoção da medicina curativa, em que o diagnóstico e o tratamento das doenças são valorizados em detrimento do foco na redução do risco dessas doenças. O sistema de saúde pública no Brasil tem priorizado a promoção da saúde e a humanização no atendimento. Entretanto, a queda do modelo hospitalocêntrico demandará tempo e investimentos também na formação de recursos humanos para a saúde.[18]

O papel da nutrição na saúde e na qualidade de vida do paciente muitas vezes não é adequadamente reconhecido por outros profissionais da área da saúde. Em geral, uma consulta médica não inclui orientações gerais acerca da alimentação saudável.[19] Ao questionar médicos nos Estados Unidos quanto aos motivos da não orientação nutricional na prática clínica, as principais alegações foram o tempo escasso das consultas, a baixa adesão do paciente às orientações nutricionais, a falta de conhecimento em nutrição humana e a remuneração insuficiente para proceder com tal abordagem na consulta. Além disso, a complexidade em trabalhar com genética clínica foi citada.[15,20] Nesse sentido, a prescrição de testes de nutrigenética fica ainda mais restrita, uma vez que o modelo de cuidado à saúde é centrado no médico.

Ainda em relação à prescrição de testes de nutrigenética, o nutricionista com especialização em genômica nutricional deverá estar apto a interpretar e a realizar o aconselhamento genômico nutricional ao paciente. Trata-se de uma oportunidade na área da nutrição que traz à prescrição nutricional individualizada uma fundamentação científica com objetivo de melhorar os resultados terapêuticos e a promoção da saúde.[15] Seguramente, o futuro da conduta do nutricionista clínico é a genômica nutricional, ainda que a maioria dos profissionais da área não tenha despertado para essa necessidade emergente.[18]

Já no que se refere aos testes genéticos preditivos para doenças raras, há uma discussão precedente avançada, inclusive sobre a regulamentação legal. Ainda que os testes de nutrigenética apresentem uma abordagem de fatores de risco para doenças de origem multifatorial, em que a detecção de marcadores genéticos não signifique uma sentença para o desenvolvimento da condição, é possível e prudente aproveitar a tônica das discussões.

Os avanços científicos e tecnológicos na área da saúde ocorrem a passos largos. No século XX foi descoberta a eficácia dos antibióticos, o que mudou os rumos de uma medicina tradicional milenar. A genômica nutricional tem se propagado rapidamente no meio científico, com o progresso constante das grandes pesquisas que firmam o conhecimento e permitem a instituição de proto-

colos. Com isso, a difusão dessa ciência entre os profissionais da área da saúde é uma etapa importante nessa evolução. Nesse sentido, uma barreira a ser transposta é a carência de profissionais de saúde especialistas nessa área. Até mesmo em países desenvolvidos, como nos Estados Unidos, o número de nutricionistas com especialização em genômica nutricional é limitado.[18,21]

A visão distorcida da genética junto à população e até mesmo dos profissionais da área da saúde prejudica a disseminação de testes genéticos no ambiente clínico e orientado. O ser humano tende a criticar e a intimidar-se com o desconhecido. Em contrapartida, a curiosidade e o acesso facilitado a testes preditivos sem aconselhamento individualizado, muitas vezes via meios eletrônicos, representa risco à saúde da população.[14]

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os benefícios da prescrição e do uso responsável dos testes genéticos, principalmente aqueles relacionados à nutrição, incluem a possibilidade de direcionar o cuidado ao paciente no que se refere à redução do risco de doenças com base na alimentação e no estilo de vida saudáveis; ao estímulo à mudança de comportamento e consciência do risco de determinadas condições de saúde; à redução da morbimortalidade prematura; à redução dos custos em saúde; à identificação de subgrupos populacionais que podem ser mais ou menos responsivos a determinada intervenção ambiental (nutricional), além da criação de biobancos de amostras com consentimento dos indivíduos.

Por outro lado, ainda é preciso elucidar muitos mecanismos envolvidos na suscetibilidade às doenças; trabalhar a falsa sensação de segurança em caso de resultados favoráveis e de pânico em caso de resultados desfavoráveis; controlar o desenvolvimento de nutricosméticos personalizados sem comprovação científica; evitar o alarme junto à população de que as informações gerais de saúde pública não seriam mais eficazes, além de controlar o risco de populações vulneráveis economicamente tornarem-se condicionadas a planos alimentares personalizados que podem ser onerosos. Outro aspecto é a confidencialidade e a necessidade de aconselhamento genômico nutricional que considera os aspectos biopsicossociais do indivíduo.

Por fim, é importante destacar a necessidade de regulamentação adequada a respeito de testes genéticos preditivos e, especificamente, daqueles de nutrigenética. Deve-se pontuar que a bioética é inerente ao comportamento do ser humano em suas atitudes diárias. Os princípios da beneficência, não maleficência, justiça, equidade e autonomia, assim, serão reflexo da boa conduta para com o próximo. Para os nutricionistas e demais profissionais de saúde, continua a prevalecer a seguinte máxima: respeitar o indivíduo e preservar a sua dignidade com foco na promoção e cuidado à saúde.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Scharamm FR, Rego S, Braz M, Palácios M. Bioética: riscos e proteção. Rio de Janeiro: UFRJ/Fiocruz; 2005.
2. Garrafa V. Resenha: bioética cotidiana. Giovanni Berlinguer. Brasília: Editora UnB; 2004. Cadernos de Saúde Pública. 2005;21(1).
3. Sociedade Brasileira de Genética Clínica. Projeto Diretrizes. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. Testes preditivos. 2007. 6p. Disponível em: http://www.projetodiretrizes.org.br/projeto_diretrizes/091.pdf. Acesso em 10 jul 2015.
4. Camp KM, Trujillo E. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: nutritional genomics. J Acad Nutrit Diet. 2014;114(2): 299-312.
5. Carvalho MAC. O processo nutricional e a bioética: perspectivas da teoria semiótica e teoria da auto-organização. Simbio-logias. 2013;6(8).
6. Goldim JR. Genetics and ethics: a possible and necessary dialogue. Journal of Community of Genetics. 2015;6(3):193-6.
7. Mayor F. The Universal Declaration on the Human Genome and Human Rights. Comptes Rendus Biologies. 2003;326(10-11): 1121-5.
8. Reitz C. Dyslipidemia and the Risk of Alzheimer's Disease. Current Atherosclerosis Reports. 2013;15(3):307-21.
9. Salles AA. Aspectos éticos dos testes preditivos em doenças de manifestação tardia. Revista Brasileira de Saúde Materno-Infantil. 2010;10(supl. 2):S271-7.
10. Brzezianska E, Domanska D, Jegier A. Gene doping in sport – perspectives and risks. Biology of Sport. 2014;31(4):251-9.
11. Botkin JR, Belmont JW, Berg JS, Berkman BE et al. Points to consider: ethical, legal, and psychosocial implications of genetic testing in children and adolescents. American Society of Human Genetics Board of Directors, American College of Medical Genetics Board of Directors. American Journal of Human Genetics. 1995;57(5):1233-41.
12. Conselho Nacional de Saúde (Brasil). Resolução nº 340 de 8 de julho de 2004. Disponível em http://andromeda.ensp.fiocruz.br/etica/sites/default /files/documentos/Res%20340_2004.pdf. Acesso em 15 jul 2015.
13. Conselho Regional de Nutricionistas – 3ª Região (SP/MS). Colegiado 2014-2017. Parecer Técnico CRN-3 nº 09/2015. Genômica nutricional: testes de nutrigenética. Disponível em: http://crn3.org.br/wp-content/uploads/2015/04/GENoMICA-NUTRICIONAL-TESTES-DE-NUTRIGENeTICA.pdf. Acesso em: 8 jul 2015.
14. Ries NM, Castle D. Nutrigenomics and ethics interface: direct-to-consumer services and commercial aspects. OMICS. 2008;12(4):245-50.
15. De Busk RM, Fogarty CP, Ordovas JM, Kornman KS. Nutritional genomics in practice: where do we begin? Journal of the American Dietetic Association. 2005;105(4):589-98.
16. Brasil. Conselho Federal de Nutricionistas. Resolução CFN nº 334 de 10 de maio de 2004. Dispõe sobre o Código de Ética do Nutricionista e dá outras providências. Brasília, DF: CFN, 2004. Disponível em http://www.cfn.org.br/novosite/pdf/codigo/codigo%20de%20etica_nova%20redacao.pdf. Acesso em 15 jul 2014. 22 p.

17. Centers for Disease Control and Prevention. Genomic tests and family history by levels of evidence. 2013. Disponível em http://www.cdc. gov/genomics/gtesting/tier.htm. Acesso em 22 jul 2015.
18. Castle D, Ries M. Ethical, legal and social issues in nutrigenomics: the challenges of regulating service delivery and building health professional capacity. Mutation Research. 2007;622(1-2):138-43.
19. Kushner RF. Barriers to providing nutrition counseling by physicians: a survey of primary care practitioners. Preventive Medicine. 1995;24(6):546-52.
20. Jenkins J, Blitzer M, Boehm K, Feetham S, Gettig E, Johnson A et al. Recommendation of the core competencies in genetics essential for all health professionals. Genetics in Medicine. 2001;3(2):155-9.
21. Reilly PR, Debusk RM. Ethical and legal issues in nutritional genomics. Journal of the American Dietetic Association. 2008;108(1):36-40.

Índice remissivo

Q

R

S

T

U

V

W

Z

A publicação da sequência completa do genoma humano, em 2003, promoveu impactos em diversas áreas do conhecimento, inclusive na Nutrição.

Os estudos de genética humana, de expressão gênica, de nutrigenômica, de nutrigenética e de epigenética estão revolucionando o conhecimento atual ao demonstrar a importância da relação dos nossos genes com a alimentação e seus efeitos na saúde.

Organizado por pesquisadores com vasta experiência em Genômica nutricional e contando com a participação de renomados pesquisadores brasileiros e estrangeiros desta área, esses temas temas são contemplados neste livro – a primeira obra brasileira sobre o assunto – de forma clara e com linguagem didática, que aborda, entre outros temas:

- Conceitos básicos de genética humana, incluindo aspectos históricos, princípios básicos da genética de populações e genética da população brasileira, além de aspectos relativos à expressão gênica.
- Fundamentos da nutrigenômica, da nutrigenética e da epigenômica nutricional.
- Papel de nutrientes e de CBA na regulação da expressão gênica, bem como os mecanismos envolvidos na modulação desse processo.
- Importância da relação entre nutrientes, genômica nutricional e o binômio saúde-doença, com relatos acerca de aspectos da epidemiologia e da fisiopatologia das doenças, e também as associações entre os polimorfismos de nucleotídeo único, as doenças e os aspectos nutricionais.
- Resumo dos avanços e perspectivas na área.

Cada capítulo foi pensado para atender às necessidades de estudantes de graduação e de pós-graduação e daqueles que tenham interesse em se aprofundar no campo da genômica nutricional.

Dessa forma, *Genômica nutricional: dos fundamentos à nutrição molecular* torna-se essencial para o melhor entendimento de uma ciência atual e multidisciplinar, cuja visibilidade e importância vêm se ampliando ao longo dos últimos anos.